

Die Funktion
und
physiologische Bedeutung
der T-DNA-Gene von
Agrobacterium tumefaciens

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Kurt Spanier
aus Gelsenkirchen

Bochum 1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546604_0015

Die Funktion
und
physiologische Bedeutung
der T-DNA-Gene von
Agrobacterium tumefaciens

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Kurt Spanier
aus Gelsenkirchen

Bochum 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Schieder
2. Berichterstatter: Prof. Dr. N. Amrhein

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.1987

Für Adelheid

INHALTSVERZEICHNIS

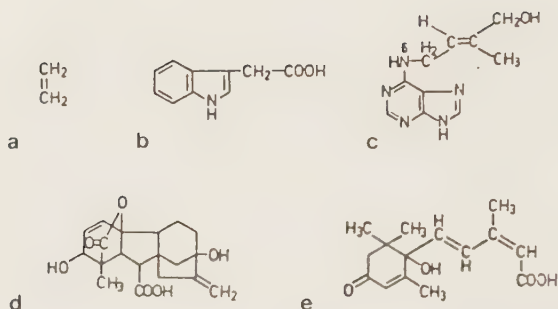
	Seite
<u>1 EINLEITUNG</u>	1
<u>2 MATERIAL UND METHODEN</u>	15
2.1 Pflanzenmaterial	15
2.2 Bakterien und Phagen	16
2.2.1 Herkunft und Charakterisierung	16
2.2.2 Kultivierung	16
2.3 Phytohormonbestimmung	21
2.3.1 Aufbau und Durchführung von Radioimmunoassays	21
2.3.2 Aufschluß von Pflanzenmaterial und Auswertung von RIA-Daten	22
2.4 Klonierung von DNA	23
2.4.1 Phagen und Plasmide	23
2.4.2 Isolation von DNA	23
2.4.3 Restriktionsverdauungen, Generierung von glatten DNA-Enden und Ligation von DNA	24
2.4.4 Analytische und präparative Gelelektrophorese	25
2.4.5 Transformation von <u>E. coli</u>	26
2.4.6 Isolation rekombinanter Plasmide und Phagen unter Ausnutzung der Alpha-Komplementation der Beta-Galaktosidase	27
2.4.7 DNA-Verdauung mit der Exonuklease Bal31	28
2.4.8 Linkerphosphorylierung	28
2.4.9 Isolation und Sequenzierung von einzelsträngiger Phagen-DNA	28
2.5 Isolation von <u>Agrobacterium</u> -Mutanten	29
2.6 Inokulation von <u>Nicotiana tabacum</u> mit <u>Agrobacterium tumefaciens</u>	29
2.7 Biochemischer Nachweis transgener Pflanzen	30
2.8 Isolation, Reinigung und Analyse einer unbekannten, fluoreszierenden Substanz	30
<u>3 ERGEBNISSE</u>	32
3.1 Phytohormonbestimmung in Crown Gall Tumorgewebe von <u>Nicotiana tabacum</u>	32
3.1.1 Cytokiningehalt von <u>in vitro</u> -Zelllinien	32
3.1.2 Hormonveränderungen bei der Tumorentwicklung <u>in vivo</u>	34
3.1.2.1 Zeitlicher Verlauf	34
3.1.2.2 Verteilung von Cytokininderivaten	38

	Seite
3.2	Isolation und Klonierung von T-DNA-Genen 41
3.2.1	Klonieren der Gen <u>6b</u> -kodierenden Region 41
	hinter den 1'-Promotor der T _R -DNA
3.2.1.1	Struktur der T _R -DNA eines Ti-Plasmids vom 41
	Octopintyp und des Gens <u>6b</u>
3.2.1.2	Klonierungsstrategie zum Erzeugen einer 44
	promotorlosen Gen <u>6b</u> -Konstruktion
3.2.1.3	Entfernen des Gen <u>6b</u> -Promotors 45
3.2.1.4	Gen <u>6b</u> unter der Kontrolle des 50
	T _R -Promotors
3.2.2	Subklonieren eines Fragments mit Gen <u>6b</u> 50
	unter Kontrolle des T-DNA-eigenen Promotors
3.2.3	Überführen der Gene <u>6b</u> und <u>4</u> in die 51
	T-DNA
3.2.3.1	Weiterentwicklung von binären T-DNA-Vektoren 51
3.2.3.2	Klonieren von T-DNA-Genen in pSRB3 und pSRB4 53
3.2.4	Transfer von <u>E. coli</u> -Plasmiden nach 55
	<u>Agrobacterium</u>
3.3	Analyse der physiologischen Wirkung von 57
	T-DNA-Gen <u>6b</u>
3.3.1	<u>In vitro</u> -Infektion von Blattscheibchen 57
3.3.2	Regeneration transgener Pflanzen mit Gen <u>6b</u> 67
	unter Kontrolle des 1'-Promotors der T _R -DNA
3.3.3	Erste Charakterisierung einer Gen <u>6b</u> - 67
	spezifischen Substanz
4	<u>DISKUSSION</u> 71
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u> 91
6	<u>VERZEICHNISSE</u> 94
6.1	Abkürzungen 94
6.2	Tabellen 96
6.3	Abbildungen 97
6.4	Literatur 99

1 EINLEITUNG

Die Entwicklung von Pflanzen wird durch eine Vielfalt verschiedener Einflüsse gesteuert. Exogene Faktoren, wie Licht, Wasser, Temperatur und Nährstoffzufuhr, aber auch endogene Vorgänge, wie die Nährstoffverteilung und insbesondere der Phytohormonhaushalt sind von entscheidender Bedeutung. Im Gegensatz zu tierischen Organismen verfügen Pflanzen nicht über ein zentralnervöses Steuerungssystem, so daß sie bei der Regelung und Koordinierung von Wachstumsvorgängen ausschließlich auf chemische Botenstoffe angewiesen sind. Diese in äußerst geringer Konzentration wirksamen Übermittler entwicklungsphysiologischer Informationen werden in Analogie zu Tieren "Pflanzenhormone", "Phytohormone" oder "pflanzliche Wachsstoffe" genannt.

Die bisher eindeutig als Phytohormone identifizierten Substanzen werden in fünf chemisch verschiedene Stoffklassen unterteilt, deren Biosynthesewege nur zum Teil bekannt sind. Das gasförmige Ethylen wird in Pflanzen durch Abbau von Methionin erzeugt (Yang und Hoffman 1984), während eine andere Aminosäure, Tryptophan, Ausgangssubstanz für die Synthese bestimmter Indolderivate, den Auxinen ist (Schneider und Wightman 1974). Cytokinine leiten sich als Derivate von Adenin aus dem Purinstoffwechsel ab (Letham und Palni 1983). Einen gemeinsamen Ursprung, den Terpenoidstoffwechsel, haben Gibberelline als Diterpene und die Abscissinsäure, ein Sesquiterpen (Milborrow 1974, Hedden et al. 1978). Einen zusammenfassenden Überblick über Biosynthese und Metabolismus von Phytohormonen geben Sembdner et al. (1980). Im Gegensatz zu tierischen ist bei den pflanzlichen Hormonen die Zuordnung von Biosyntheseort, Transportweg und Wirkungsort nicht eindeutig zu treffen. Phytohormone wirken in verschiedenen Teilen der Pflanze in unterschiedlicher Art und Weise und können sich dabei gegenseitig beeinflussen (siehe Zusammenfassung bei Scott 1984). Abbildung 1 zeigt Vertreter der fünf Hormonklassen.



- a. Ethylen
- b. Indol-3-essigsäure
- c. trans-Zeatin
- d. Gibberellinsäure
- e. (+)-(S)-Abscisinsäure

Abb. 1: Strukturformeln der Hauptvertreter der fünf Phytohormonklassen. Mit Ausnahme von Ethylen sind in jeder Klasse eine Reihe verschiedener Derivate bekannt (aus Heß 1979)

Im allgemeinen unterscheidet man die wachstumsfördernden Auxine, Cytokinine und Gibberelline von den hemmenden Hormonen, Abscisinsäure und Ethylen. So fördern Auxine und Gibberelline u. a. die Zellstreckung (Sachs 1965, Kazama und Katsumi 1973, 1974), Cytokinine die Zellteilung (Miller 1965). Andererseits werden Vorgänge wie Blattfall, Fruchtfall (Abscission) und Senescenz einer Pflanze durch Abscisinsäure und Ethylen ausgelöst (Sexton und Roberts 1982).

Die physiologischen Wirkungen der Pflanzenhormone können auch durch exogene Applikation hervorgerufen werden. Dieser Umstand ist von grundlegender Bedeutung für Versuche, bei denen Pflanzen oder deren Teile auf künstlichen Nährböden in vitro-Kulturen gezogen werden. Skoog und Miller (1957) konnten zeigen, daß das Wachstum von Parenchymexplantaten

von Nicotiana tabacum durch Auxin und Cytokinin im Wuchsmedium entscheidend beeinflußt wird; ohne diese Wuchsstoffe kann sich das Pflanzenmaterial nicht entwickeln. Durch Zufügen von Auxin ins Medium wird Zellstreckung induziert, während signifikante Zellteilung erst nach zusätzlicher Gabe von Cytokinin zu beobachten ist. Neben dem Wachstum der Explantate wird auch die Differenzierung durch diese beiden Hormone gesteuert. Bei einem hohen Verhältnis von Cytokinin zu Auxinen bilden sich Sprosse, bei einem niedrigen Wurzeln. Ist das Verhältnis intermediär, wachsen die Explantate unorganisiert als sog. Kallus. Diese Beobachtungen waren Grundlage für die heute z. T. schon bis zur kommerziellen Reife entwickelten Zellkulturtechniken (Evans et al. 1983, Yeoman 1986).

Die Identifizierung und Quantifizierung pflanzlicher Wuchsstoffe ist aufgrund ihrer sehr geringen Konzentration und vielfachen Derivatisierung im biologischen Material äußerst schwierig (Weiler 1982). Für eine eindeutige Strukturauflösung ist oft die Isolation der biologisch aktiven Substanz(en) aus großen Mengen Pflanzengewebes erforderlich (z. B. 84 kg Maiskörner bei der Entdeckung von Zeatin, Miller 1961). Im allgemeinen werden chromatographische Methoden, wie Dünnschicht-, Hochdruckflüssigkeits- (HPLC) oder Gaschromatographie verbunden mit Massenspektroskopie (GC-MS) für die Identifizierung eingesetzt (Yokota et al. 1980, Brenner 1981). Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe von Bioassays, physico-chemischer (HPLC, GC-MS) und immunologischer Methoden, wie Radio- oder Enzymimmunoassay (RIA, EIA; Reeve und Crozier 1980, Neill et al. 1983, Weiler 1984).

Bei allen diesen Techniken treten oft große Probleme mit Artefaktbildungen auf. Im Verlauf der Extraktion kann es zu unerwünschten Enzymreaktionen oder rein chemischen Reaktionen mit dem Extraktionsmittel kommen, so daß andere Substanzen gemessen werden als in der Pflanze vorhanden sind (Zenk 1961, Bialeski 1964, Tay et al. 1986). Auch beeinflussen häufig Fremdstoffe im Extrakt die Wechsel-

wirkung der zu messenden Moleküle mit dem Meßdetektor (Reeve und Crozier 1980). Im allgemeinen hat dieser darüberhinaus verschiedene Empfindlichkeiten gegenüber unterschiedlichen Derivaten der Phytohormone, so daß eine exakte Quantifizierung dieser Substanzen erschwert wird (z. B. verschiedene Aufnahmeraten und die sofortige Metabolisierung bei Bioassays oder teilweise unbekannte Kreuzreaktionen der eingesetzten Antikörper bei Immunoassays; Palni et al. 1984, Badenoch-Jones et al. 1984). Die erwähnten Schwierigkeiten machen es in vielen Fällen unmöglich, die biologische Relevanz eines gegebenen Hormonderivats exakt zu bestimmen.

Viele der in den letzten Jahren erzielten Fortschritte in der Hormonphysiologie, besonders von Auxinen und Cytokinen, wurden an einem besonderen biologischen System erzielt: den Crown Gall Tumoren oder Wurzelhalsgallen vieler Di- und einiger Monokotyledonen (De Cleene und De Ley 1976). Diese Erkrankung wird durch ein aerobes, gramnegatives Bakterium, Agrobacterium tumefaciens (Smith und Townsend 1907), hervorgerufen und stellt einen gravierenden Einschnitt in die normale Entwicklung einer Pflanze dar. Nach Eindringen von Agrobacterium in eine Wunde bildet sich an dieser Infektionsstelle ein Tumor, der in seinem Wachstum von der Pflanze nicht mehr kontrolliert werden kann. White und Braun (1941) und Braun und White (1943) konnten zeigen, daß dieser Zustand auch in Abwesenheit der Bakterien aufrechterhalten wird und Tumorgewebe in vitro ohne die Zugabe von Phytohormonen ins Medium wachsen kann. Daher wurde, ähnlich der malignen Transformation tierischen Gewebes, die Wirkung eines tumorinduzierenden Prinzips (TIP; Braun 1947) gefordert, das die Pflanze nachhaltig verändert.

Die stabil erworbene Hormonautotrophie von Wurzelhalsgallen führte zu der Hypothese, daß Agrobacterium direkt oder indirekt in den Phytohormonhaushalt der infizierten Pflanze eingreift (Braun 1958). In der Tat konnten erhöhte Auxin- und Cytokiningehalte in transformierten Pflanzengeweben festgestellt werden, wobei eine Vielzahl verschiedener Derivate, vor allem der Cytokine, nachweisbar waren (Feung

et al. 1976, Weiler und Spanier 1981, Palni et al. 1983). Das System "Crown Gall" erwies sich daher als eine ausgezeichnete Quelle für grundlegende Untersuchungen zur Hormonphysiologie. Insbesondere konnte gezeigt werden, daß Cytokinine in der Pflanzenzelle einem intensiven Metabolismus unterliegen und einige Derivate als Speicher- oder Detoxifizierungsformen dieser Hormonklasse anzusehen sind (Laloue et al. 1981, Letham und Palni 1983).

Unklar blieb lange Zeit, wie Agrobacterium diese Veränderungen in der Entwicklung der Pflanze auslöst, worin also die Natur des TIP bestand. Erst im Jahre 1974 wurde nachgewiesen, daß ein etwa 100-150 Megadalton großes Plasmid von Agrobacterium in jedem Fall mit der Virulenz korreliert war (Zaenen et al. 1974, Van Larebeke et al. 1974). Dieses Plasmid wurde Ti-Plasmid (tumorinduzierendes Plasmid) genannt. Aufgrund ungewöhnlicher Aminosäurederivate, den sog. Opinen, die in der transformierten Pflanzenzelle produziert werden und deren Information für Synthese und Katabolismus auf dem Plasmid kodiert sind (Bomhoff et al. 1976, Schell et al. 1979), wurden Ti-Plasmide u. a. in den Octopin- und Nopalintyp eingeteilt. Plasmide derselben Gruppe von verschiedenen Agrobacterium-Wildtypstämmen sind zum Großteil homolog, während zwischen Octopin- und Nopalinplasmiden nur wenig Übereinstimmung besteht (Currier und Nester 1976, Sciaky et al. 1978, Engler et al. 1981).

Untersuchungen an transformierten Geweben zeigten, daß ein kleiner Teil des Ti-Plasmids, die sog. T-DNA (Transfer-DNA; auch T-Region genannt), ins nukleäre Genom der Pflanzenzelle integriert und dort exprimiert wird (Chilton et al. 1977, Gurley et al. 1979, Willmitzer et al. 1980, Lemmers et al. 1980). Es stellte sich heraus, daß Nopalinplasmide eine, Octopinplasmide zwei T-Regionen enthalten - die zur Nopalinn-T-DNA weitgehend homologe T_L - und die nichthomologe, nicht regelmäßig nachzuweisende T_R -DNA. Mit der Entwicklung molekularbiologischer Methoden wurde es möglich, das Ti-Plasmid funktionell zu charakterisieren. Durch Transposonmutagenese des Plasmids und Northern-Blot-Analyse trans-

formierter Gewebe konnten mehrere genetische Loci der homologen T-DNAs identifiziert werden, die für die Transformation der Pflanze verantwortlich sind (Holsters et al. 1980, Garfinkel und Nester 1980, Leemans et al. 1981, 1982a, Joos et al. 1983). Diese in der Pflanzen- (Willmitzer et al. 1981, 1982, 1983) und Bakterienzelle aktiven Gene (Schröder et al. 1983, Janssens et al. 1984) wurden der Größe ihrer Transkripte entsprechend von 1 bis 7 durchnummeriert, wobei Gen 7 nur in Octopinplasmiden vorhanden ist. Zwei Gene erhielten aufgrund etwa gleich großer Transkripte die Bezeichnungen "6a" und "6b".

Nach Inokulation verschiedener Wirtspflanzen (z. B. Nicotiana tabacum oder Kalanchoe daigremontiana) mit zahlreichen T-DNA-Mutanten wurden Tumoren mit veränderten Phänotypen gefunden. Abweichend von dem normalen, unorganisierten Erscheinungsbild traten sproß- und wurzelbildende Tumoren auf. Eine genaue Analyse zeigte, daß Sproßbildung mit der Inaktivierung der Gene 1 und/oder 2, Wurzelbildung mit dem Ausschalten von Gen 4 korreliert war (Garfinkel et al. 1981, Leemans et al. 1982a, Joos et al. 1983). Kultivierte man die Sprosse in vitro, entwickelten sie sich zum überwiegenden Teil phänotypisch normal, wobei auch keine Opine nachweisbar waren. Daher wurde eine den beschriebenen Versuchen mit exogenen Auxin- und Cytokiningaben (Skoog und Miller 1957) vergleichbare hormonelle Beeinflussung untransformierter Gewebe durch transformierte Zellen postuliert (Van Slogteren et al. 1983, Leemans et al. 1983). Den Genen 1 und 2 wurde ein gekoppelter Auxin-, dem Gen 4 ein Cytokinineffekt zugeschrieben (Leemans et al. 1982a, Joos et al. 1983). Agrobacterium-Mutanten mit Defekten in diesen Genen wurden "tms"- oder "shi"- bzw. "tmr"- oder "roi"-Mutanten genannt (tms/tmr = "shoot/root producing tumors", Garfinkel et al. 1981; shi/roi = "shoot/root induction", Joos et al. 1983). Eine gängige Bezeichnung ist außerdem "shooter" und "rooter".

Das Auftreten von Sproß- und Wurzelbildung und die enge Korrelation dieser Phänotypen mit Loci der T-DNA veranlaßten

Akiyoshi et al. (1983), Auxin- und Cytokiningehalte in Tumoren von Nicotiana tabacum zu untersuchen, die durch "shooter"- und "rooter"-Mutanten von Agrobacterium tumefaciens hervorgerufen waren. Sie fanden signifikante Unterschiede im Verhältnis der beiden Phytohormone in Abhängigkeit von den benutzten T-DNA-Mutanten und den damit verbundenen phänotypischen Erscheinungsbildern. Die Ergebnisse - ein hohes endogenes Cytokinin/Auxin-Verhältnis bei Sproß-, ein niedriges bei Wurzelbildung - erhärteten weiter die Modellvorstellung von einem Eingriff der T-DNA-Gene in den Phytohormonhaushalt, verbunden mit einer Änderung der pflanzlichen Entwicklung (siehe auch Amasino und Miller 1982, 1982/1983).

Neben den beschriebenen Untersuchungen in vivo wurden auch Versuche unternommen, die Funktion der T-DNA-Gene in vitro zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden die Gene 1, 2 und 4 isoliert und einzeln in spezielle bakterielle Plasmide (Expressionsvektoren) kloniert. Nach Transkription und Translation der Gene in Escherichia coli waren Tests mit den Genprodukten im Reagenzglas möglich. Schröder et al. (1984) konnten mit dieser Methode nachweisen, daß Gen 2 für ein Enzym kodiert, welches Indol-3-essigsäure (IES; siehe Abb. 1) synthetisiert. Substrat bei dieser Reaktion ist, neben anderen (Kemper et al. 1985), Indol-3-acetamid (IAM), das durch eine Amidohydrolasereaktion in das aktive Auxin überführt wird (Gen 2 wird daher auch als Gen iaaH bezeichnet, Kemper et al. 1985). Die nach in vivo-Experimenten (Van Onckelen et al. 1985) postulierte, durch Gen 1 kontrollierte Monooxygenasereaktion von Tryptophan (Trp) nach IAM wurde zunächst in zellfreien Crown Gall- (Van Onckelen et al. 1986), dann auch in E. coli-Extrakten nachgewiesen (Thomashow et al. 1986). Daher wird Gen 1 auch Gen iaaM genannt (Follin et al. 1985, Van Onckelen et al. 1986). Der aufgezeigte Reaktionsweg von Trp über IAM zur IES ist in Abb. 2a dargestellt.

Gen 4 der T-DNA kodiert für eine Dimethylallylpyrophosphat:AMP-Transferase (DMA-Transferase; auch als Isopentenyl-

Transferase bezeichnet), die Dimethylallylpyrophosphat (DMA-PP), oder das damit im Gleichgewicht stehende Isopentenylpyrophosphat (iPP), mit dem N⁶ von Adenosinmonophosphat (AMP) kovalent verbindet (siehe Abb. 2b; Barry et al. 1984, Akiyoshi et al. 1984, Buchmann et al. 1985). Barry et al. (1984) haben daher für das Gen den Namen Gen ipt vorgeschlagen. Das bei der Reaktion entstehende Isopentenyladenosin-5'-monophosphat (iP-5'-AMP) ist ein in der Pflanze wirksames Cytokinin. Aufgrund der Tatsache, daß Cytokinine vom Isopentenyladenosintyp in Crown Gall Tumoren bisher nicht in erhöhtem Maße festgestellt wurde (Scott et al. 1980), wohingegen der Zeatintyp, bei dem eine Methylgruppe der Seitenkette hydroxyliert ist (siehe Abb. 1), dominiert, kann man eine rasche und effiziente Derivatisierung des ersten Enzymprodukts in der Pflanze erwarten (Palni und Horgan 1983, Einset 1984). Mit diesem direkten Eingriff in den Cytokinin- und Auxinstoffwechsel schafft Agrobacterium tumefaciens für die Pflanze unkontrollierbare Hormonverhältnisse, die mit den anormalen morphologischen Veränderungen verbunden sind. Aus diesem Grund werden die Gene 1, 2 und 4 in Analogie zu tierischen Tumorsystemen Onkogene genannt.

Die Produktion der Opine in der pflanzlichen Zelle konnte ebenfalls auf bestimmte Gene der T-DNA zurückgeführt werden. Es wurde gezeigt, daß Gen 3 bei beiden erwähnten Plasmidtypen für Enzyme kodiert, die diese Reaktionen katalysieren (Leemans et al. 1982a, Joos et al. 1983). Bei Octopinplasmiden ist dies die Lysopindehydrogenase (LpDH; auch Octopinsynthase, Ocs; Hack und Kemp 1980), bei Nopalinsplasmiden die Nopalinsynthase (Nos), welche von Gafni und Chilton (1985) durch Klonieren von Gen 3 eines Nopalinsplasmids auch in vitro exprimiert wurde. Die T_R-DNA der Octopinplasmide kodiert darüberhinaus für weitere Enzyme, die Opine vom Agropin- und Mannopintyp synthetisieren (Velten et al. 1983, Ellis et al. 1984, Salomon et al. 1984).

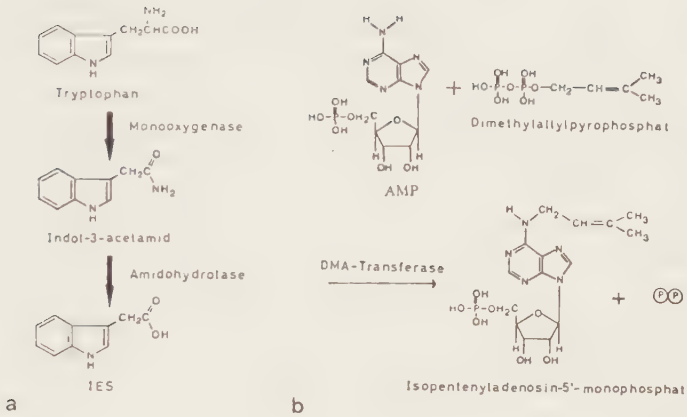


Abb. 2: Phytohormonsynthese mit von den T-DNA-Genen 1, 2 und 4 kodierten Enzymen.

- a. Sequentielle Umwandlung von Tryptophan in das Auxin Indol-3-essigsäure mit dem Zwischenprodukt Indol-3-acetamid (aus Thomashow et al. 1986)
- b. Cytokininbiosynthese durch kovalente Verknüpfung von Dimethylallylpyrophosphat mit AMP (aus Akiyoshi et al. 1984)

Eine Funktion bei der Exkretion von Opinen ist von Messens et al. (1985) für Gen 6a beschrieben worden. Keine eindeutige Funktionszuordnung ist dagegen bisher für die Gene 5, 6b und 7 bekannt. Als ein Indiz für die Funktion von Gen 6b ist von Garfinkel et al. (1981) beschrieben worden, daß T-DNA-Mutanten mit einem Defekt in dieser DNA-Region etwa doppelt so große Tumoren induzieren wie Wildtypbakterien. Aus diesem Grund wurde Gen 6b als "tml"-Locus ("large tumors") bezeichnet.

Die Gene der T-DNAs verschiedener Agrobacterium-Stämme sind von mehreren Autoren sequenziert worden (z. B. Barker et al. 1983, Gielen et al. 1984, Goldberg et al. 1984, Klee et al. 1984), wobei sich Aminosäure- und DNA-Sequenzhomologien zwischen den Onkogenen und entsprechenden Genen eines anderen phytopathogenen Bakteriums, Pseudomonas savastanoi ergaben (Yamada et al. 1985, Powell und Morris 1986). Auch dieses Bakterium ruft tumoröses Wachstum bei Pflanzen hervor, doch wird dies nur durch eine ständige Phytohormonproduktion und -ausscheidung durch den Mikroorganismus erreicht (Kado 1984). Welche Rolle die ebenfalls bei Agrobacterium beobachtete Ausscheidung von Pflanzenhormonen (Liu und Kado 1979, Regier und Morris 1982) dagegen bei der Induktion der Crown Gall Tumoren spielt, ist unklar. Möglicherweise wird dadurch eine Konditionierung der Pflanzenzellen erreicht, so daß der anschließende T-DNA-Transfer stattfinden kann (Liu et al. 1982). Aufgrund der Übereinstimmungen der DNA- und Aminosäuresequenzen scheinen bei beiden Bakterien homologe Enzymsysteme vorzuliegen, was insbesondere für den Auxinbiosyntheseweg zutrifft (Hutcheson und Kosuge 1985, Schell 1986).

Parallel zu den beschriebenen Versuchen, die Funktionen der einzelnen T-DNA-Gene aufzuklären, wurde untersucht, wie Agrobacterium die T-DNA in die Pflanzenzelle einschleust. Man stellte fest, daß Gene in der sog. Vir-Region des Ti-Plasmids (Virulenz-Region) für den T-DNA-Transfer unverzichtbar sind (Lundquist et al. 1984, Stachel und Nester 1986). Die Funktion dieser Gene ist bis heute weitgehend unbekannt, doch weiß man, daß zwei von ihnen konstitutiv in Agrobacterium exprimiert werden, wohingegen andere induzierbar sind. Der Induktor ist ein von der verwundeten Pflanze produziertes Zimtsäurederivat, Acetosyringon (Stachel et al. 1985, 1986a).

Weiterhin fand man durch Vergleich von DNA-Sequenzen verschiedener Ti-Plasmide und transformierter Pflanzen, daß die T-DNA auf dem Plasmid durch zwei 25 Basenpaar lange, gleichsinnig orientierte DNA-Abschnitte begrenzt wird, von

denen 20-21 bp übereinstimmen (imperfect direct repeats; Yadav et al. 1982, Zambryski et al. 1982, Holsters et al. 1983). Es konnte gezeigt werden, daß nur eine dieser beiden Bordersequenzen essentiell ist, während die andere lediglich eine Festlegung der Begrenzung im Verlauf des T-DNA-Transfers zu erleichtern scheint (Wang et al. 1984, Caplan et al. 1985, Rubin 1986). Darüberhinaus sind die Bordersequenzen für den DNA-Transfer hinreichend; alle beschriebenen T-DNA-Gene können deletiert und durch Fremd-DNA ersetzt werden. Nach neuesten Ergebnissen von Stachel et al. (1986b) wird innerhalb der Bakterienzelle ein Strang der doppelsträngigen T-DNA ausgeschnitten (T-Strang) und in einem der bakteriellen Konjugation vergleichbaren Prozeß in die Pflanzenzelle übertragen. Ungeklärt bleibt aber weiterhin, wie der T-Strang in den Kern der Pflanzenzelle gelangt und dort in das Genom integriert wird.

Agrobacterium stellt somit ein natürliches System zur Veränderung pflanzlichen Erbguts dar (Schell und Van Montagu 1977). Um es auch für den Menschen nutzbar zu machen, müssen drei Voraussetzungen erfüllt sein: 1) Es muß möglich sein, beliebige DNA in die T-DNA einzubauen und durch Agrobacterium in die Pflanze übertragen zu lassen, 2) Aus diesen so veränderten Zellen müssen normale, fertile Pflanzen regenerierbar sein und 3) Die mit Hilfe von Agrobacterium in die Pflanze übertragene Fremd-DNA sollte strukturell stabil integriert bleiben und korrekt exprimiert werden (Leemans et al. 1982b). Die bereits beschriebenen Versuche mit Transposonmutanten der T-DNA (s. o.) zeigten, daß die Übertragung und Integration fremder DNA grundsätzlich möglich ist. Intakte, transformierte Pflanzen konnten aber zunächst wegen der Wirkung der Onkogene nur regeneriert werden, wenn nach der Transformation erhebliche Veränderungen im Bereich der integrierten T-DNA, wie Deletionen oder Inaktivierung der Gene durch Methylierung, aufgetreten waren (z. B. De Greve et al. 1982, Amasino et al. 1984). Der Befund, daß der T-DNA-Transfer unabhängig von der Integrität der Gene 1, 2 und 4 erfolgen kann (Hille et al. 1983), machte es dann aber möglich, durch Verwendung

solcher nichtonkogenen Agrobacterium-Mutanten normale, T-DNA enthaltende Pflanzen zu regenerieren. Die anfängliche Schwierigkeit, daß Fremd-DNA in Pflanzen nicht oder unkorrekt exprimiert wurde (Shaw et al. 1983, Koncz et al. 1984), konnte durch Ersetzen der für die Genregulation verantwortlichen Promotoren durch entsprechende, in Pflanzen wirksame DNA-Abschnitte umgangen werden (Herrera-Estrella et al. 1983a, De Block et al. 1984, Gelvin et al. 1985).

Das Ti-Plasmid von Agrobacterium kann also als Vektorsystem benutzt werden, um Pflanzen gezielt genetisch zu verändern. Hierfür wurden zunächst "Kointegrationsvektoren", wie pGV3850 und pGV3851 (Zambryski et al. 1983, 1984) entwickelt. Bei diesen Ti-Plasmid-Derivaten ist ein Großteil der T-DNA deletiert und durch die DNA eines E. coli-Plasmids (pBR322; Bolivar et al. 1977) ersetzt. Die nichtveränderte Vir-Region und die Bordersequenzen sind dabei für den Transfer und die Integration der T-DNA ausreichend. Nach Klonierung in pBR322 oder ähnlichen Plasmiden kann beliebige DNA von E. coli in Agrobacterium überführt und durch homologe Rekombination im Bereich der pBR-Sequenzen in die T-DNA dieser Vektoren eingebaut werden (Kointegratbildung; Van Haute et al. 1983).

Der Nachweis, daß der Transfer der T-DNA von Agrobacterium in die Pflanze auch möglich ist, wenn die Vir- und die T-Region im Bakterium nicht auf dem gleichen Plasmid vorliegen (Hoekema et al. 1983, Hille et al. 1984), führte zur Entwicklung sog. binärer Vektorsysteme. Bei diesen stellt ein T-DNA-freies Ti-Plasmid in Agrobacterium die Funktionen der Vir-Region zur Verfügung, während die T-DNA, reduziert auf die für den Transfer notwendigen Bordersequenzen, auf pBR-ähnliche Plasmide verlagert ist. Damit diese pBR-Derivate auch ohne Kointegratbildung mit dem Ti-Plasmid eingesetzt werden können, verfügen sie über ein zusätzliches "wide-host-range"-Replikon, welches ihren Wirtsbereich so erweitert, daß sie sowohl in E. coli als auch in Agrobacterium autonom replizierfähig sind (Close et al. 1984, Bevan 1984, Hoekema et al. 1985). Durch diese

binären Vektorsysteme wurde ein Ausschluß störender pBR-Sequenzen aus der T-DNA und die Möglichkeit zur direkten Klonierung beliebiger DNA in die T-Region im leicht manipulierbaren bakteriellen Wirt Escherichia coli erreicht.

Da Hormonautotrophie aufgrund der Eliminierung der Onkogene nicht mehr zur Identifizierung transformierter Zellen bzw. Sprosse eingesetzt werden kann, verfügt die T-DNA der beschriebenen Vektorsysteme über sog. Markergene. Hierzu gehören Gene, die, in der Pflanze exprimiert, für meßbare Enzymreaktionen, wie die Synthese von Opinen (LpDH oder Nos; "screenable marker"; Otten und Schilperoort 1978, Maille 1983), oder die Resistenz gegenüber Antibiotika (z. B. Kanamycin oder Chloramphenicol; "selectable marker"; Fraley et al. 1983, Herrera-Estrella et al. 1983b) verantwortlich sind. Damit stehen Ti-Plasmidvektoren zur Verfügung, mit denen verschiedenste Fragestellungen der Grundlagen-, aber auch der angewandten Forschung untersucht werden können (z. B. Matzke et al. 1984, Greenwood und Chrispeels 1985, Schreier et al. 1985, Kaulen et al. 1986). Einen aktuellen Überblick über das System "Agrobacterium tumefaciens" geben Cheysen et al. (1985).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluß der T-DNA-Gene auf die pflanzliche Entwicklung und den Phytohormonhaushalt zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollten zunächst verschiedene, durch Agrobacterium-Mutanten induzierte in vivo-Tumoren und in vitro-Kalluskulturen von Nicotiana tabacum mit Hilfe spezifischer Radioimmunoassays untersucht werden. Dabei ging es um die Frage, welche Änderungen im Phytohormongehalt die Onkogene 1, 2 und 4 hervorrufen. Weiterhin sollte Gen 6b eines Octopinplasmids, isoliert von den übrigen T-DNA-Genen, unter Ausnutzung des Agrobacterium-Systems in eine geeignete Modellpflanze eingebracht und funktionell charakterisiert werden. Da bis dahin nur ein relativ schwacher phänotypischer Effekt beschrieben worden war (siehe Garfinkel et al. 1981), wurde angenommen, daß die Expression des Gens in der Pflanze nicht stark genug ist, um eine physiologische Ausprägung deutlich

in Erscheinung treten zu lassen (Burrell et al. 1985). Deshalb wurde der in der T-DNA vorhandene Promotor von Gen 6b gegen einen möglicherweise stärkeren, gut untersuchten ausgetauscht. Aufgrund einiger widersprüchlicher Beobachtungen verschiedener Autoren (Leemans et al. 1983, Ream et al. 1983) wurde darüberhinaus angenommen, daß Gen 6b ebenfalls in den Phytohormonhaushalt der Pflanze eingreift und hier insbesondere den Cytokininstoffwechsel beeinflusst. Die Funktion des Gens wurde daher in Zusammenwirken mit T-DNA-Gen 4, einem in der Vir-Region von Nopalinsplasmiden zusätzlich vorhandenen Gen für die Cytokininbiosynthese (Gen tzs, Akiyoshi et al. 1985; siehe Abb. 3) und exogen angebotenen Cytokininen untersucht. Als pflanzliches Transformationssystem wurden Blattscheibchen von Nicotiana tabacum ausgewählt, da hiermit eine schnelle und reproduzierbare Analyse möglich sein sollte (Horsch et al. 1985, Steffen 1986).

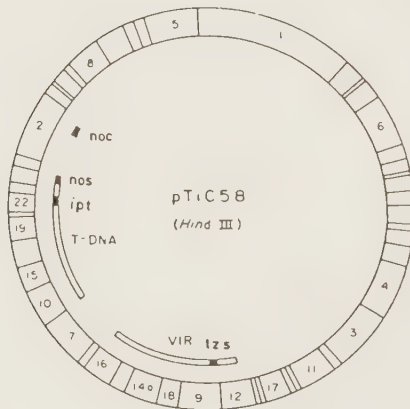


Abb. 3: Gene für die Cytokininbiosynthese bei Ti-Plasmiden vom Nopalintyp. Dargestellt ist die Lage von T-DNA-Gen 4 (**ipt**) und des Gens **tzs** für Transzeatinsynthese (**nos**, **noc** = Gene für Nopalinsynthese und -katabolismus; verändert aus Beaty et al. 1986)

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Pflanzenmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Versuche mit der Modellpflanze Nicotiana tabacum L. durchgeführt. Für in vivo-Experimente wurde Samenmaterial der Varietät Xanthi aus dem Bestand des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung, Köln, unter Standardbedingungen im Gewächshaus ausgesät und angekeimt. Nach 2-3 Wochen wurden die 5-10 cm großen Keimlinge vereinzelt und weiterkultiviert.

Die mit den T-DNA-Genen 6a und 6b transformierte Pflanze rG6a/6b der Varietät Wisconsin 38 (Inze et al. 1984) wurde von Dr. D. Inze, Reichsuniversität Gent, zur Verfügung gestellt und im Gewächshaus kultiviert.

Ausgangsmaterial bei in vitro-Versuchen waren Sproß- und Kalluskulturen, die von Dr. L. Willmitzer (1SR1, NW, 1A6 und 1GV2100), MPI Köln, und Prof. J.-P. Hernalsteens (1GV2206, 1GV2219 und 1GV2235), Freie Universität Brüssel, zur Verfügung gestellt wurden. Diese Kulturen sind in Tab. 1 näher charakterisiert. Weiterhin wurden Samen der Varietät Petit Havana "SR1" aus dem Bestand des Max-Planck-Instituts benutzt, die durch Behandlung mit 70 % Ethanol für 2 Min und einer Lösung eines handelsüblichen Haushaltsreinigers (Dan Klorix, 10 % v/v) und SDS (0.2 % w/v) für 10 Min sterilisiert wurden. Nach zweimaligem Waschen mit sterilem Wasser für je 5 Min wurden die Samen auf Kulturmedium ausgelegt.

Bei in vitro-Experimenten wurde ein abgewandeltes Kulturmedium nach Murashige und Skoog (1962) benutzt, in dem Inosit, Folsäure und Edamin fehlten (MS_3). Grundsätzlich wurden dem Medium keine Phytohormone beigelegt, außer wenn diese Bestandteil des Experiments waren. Die Kultivierung erfolgte in einem Kulturraum bei ca. 3000-5000 Lux und 22-25 °C in einem 16-Stunden-Tag. Das Pflanzenmaterial wurde alle 4-5 Wochen auf frisches Medium subkultiviert.

2.2 Bakterien und Phagen

2.2.1 Herkunft und Charakterisierung

Die in der vorliegenden Arbeit verwandten Bakterien- und Phagenstämme wurden aus Beständen des MPI, Köln, des Laboratoriums für Genetische Virologie, Freie Universität Brüssel, und des Laboratoriums für Genetik, Reichsuniversität Gent, übernommen. In Tab. 2 sind die Plasmide der benutzten Bakterienstämme, die Helfer- und Wirtsbakterienstämme sowie die Phagen mit ihren für die vorliegende Arbeit relevanten Geno- und Phänotypen aufgelistet.

2.2.2 Kultivierung

Die Agrobacterium-Stämme C58C1(pGV2215), C58C1(pGV2219), C58C1(pGV2250) und C58C1 wurden auf YEB-Agarmedium (Van Larebeke et al. 1977) kultiviert. E. coli- und die übrigen Agrobacterium-Stämme wurden in YT-Flüssigmedium bzw. auf YT-Agarplatten angezogen (Miller 1972). Allen Wachstumsmedien wurden die in Tab. 2 bezeichneten Antibiotika zugesetzt, wobei in Flüssigkulturen die Hälfte der angegebenen Konzentration benutzt wurde. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C über Nacht (E. coli) bzw. 28 °C für mindestens 36 Stunden (Agrobacterium), wobei Flüssigkulturen ständig geschüttelt wurden. Agarplatten wurden nach der Kultivierung bei 4 °C gelagert und für maximal 2 Monate benutzt, während Flüssigkulturen nach spätestens 2-3 Tagen verworfen wurden.

Zur Kultivierung von M13-Phagen wurden 50 µl einer frischen BMH71-18-Kultur mit 50 µl Phagenlysat für 20 Min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Danach wurden 3 ml dYT-Medium (Miller 1972) mit jeweils 20 µl der Vorkultur und frischer BMH71-18-Kultur angeimpft. Die Kultivierung erfolgte anschließend bei 37 °C unter ständigem Schütteln über Nacht. Frisches Phagenlysat wurde durch 5-minütiges Abzentrifugieren der Bakterien in einer Eppendorffzentrifuge erhalten. Der klare Überstand mit den Phagen wurde bei 4 °C gelagert.

Tab. 1: In vitro-Kulturen von Nicotiana tabacum

	Spezifikation	Referenz
LSR1	Untransformierte Sproßkultur der Varietät Petit Havana "SR1"	Maliga et al. 1973, 1975
NW	Phytohormoneautotrophe (habituierte) Kalluslinie der Varietät White Burley	Willmitzer et al. 1982
IA6	Kalluskultur der Varietät White Burley, transformiert mit dem Wildtypbakterium A6	Willmitzer et al. 1982
1GV2100	C58C1(pGV2100)-transformierte Kultur der Varietät Wisconsin 38 (W38); Tn7-Insertion in T-DNA-Gen <u>2</u> von pTiB6S3, "shooter"	De Greve et al. 1982
1GV2206	C58C1(pGV2206)-transformierte Kultur der Varietät W38; Deletion in T-DNA-Genen <u>1</u> und <u>2</u> von pTiB6S3, "shooter"	Leemans et al. 1981
1GV2219	C58C1(pGV2219)-transformierte Kultur der Varietät W38; Deletion von T-DNA-Genen <u>1</u> , <u>2</u> , <u>5</u> und <u>7</u> aus pTiB6S3, "shooter"	Leemans et al. 1982a
1GV2235	C58C1(pGV2235)-transformierte Kultur der Varietät W38; wie 1GV2219, dazu Tn5-Insertion in T-DNA-Gen <u>6b</u> , "shooter"	Leemans et al. 1983

Tab. 2: Plasmide, Bakterien- und Phagenstämme; Ausgangsmaterial

Spezifikation	Referenz
<u>Ti-Plasmid-Derivate (in C58C1)</u>	
pGV2208 Deletion von T-DNA-Gen 3 aus pTiB6S3; Virulenz zeigt keinen Unterschied zu pTiB6S3	Leemans et al. 1981
pGV2215 Deletion der T-DNA-Gene <u>1</u> und <u>2</u> aus pTiB6S3; "shooter"; Km ^r , Rif ^r	Leemans et al. 1982a
pGV2219 Deletion der T-DNA-Gene <u>1</u> , <u>2</u> , <u>5</u> und <u>7</u> aus pTiB6S3; "shooter"; Rif ^r	Leemans et al. 1982a
pGV2250 Transposon-Insertion in T-DNA-Gen <u>4</u> von pTiB6S3; "rooter"; Km ^r , Rif ^r	Leemans et al. 1983
pGV3850 Ti-Plasmid-Vektor vom Nopalintyp, Ersatz der T-DNA bis auf Gene <u>3</u> und <u>a</u> durch pBR322; Cb ^r	Zambryski et al. 1983
pGV2260 Ti-Helferplasmid vom Octopintyp, Ersatz beider T-DNAs durch pBR322; Cb ^r	Deblaere et al. 1985

Tab. 2: Fortsetzung

Spezifikation	Referenz
<u>f. coli-Plasmide</u>	
pUC8, pUC18	pBR322-Derivate mit einem Segment aus dem E. coli lacZ-Gen und verschiedenen "Polylinkern"; Amp ^r Vieira und Messing 1982
pHD103	Bam ^H I-Fragment 17a von pTiAch5 in pUR2-Bam (Rüther 1980); Amp ^r J. Schröder, pers. Mitteilung
pGV0507	EcoRI-Fragment 7 von pTiAch5 in pBR325; Amp ^r , Tet ^r R. Deblaere, pers. Mitteilung
pAS2022	pBR322-Derivat mit dem 1'-2'-Doppelpromotor der T _R -DNA; Kanamycinresistenzgen von In5 hinter 2'-Promotor für Km-Selektion in Pflanzen, "leerer" 1'-Promotor; Cb ^r , Sm ^r , Sp ^r Velten und Schell 1985
pGV943	Derivat von pGV815 (Deblaere et al. 1985) mit "wide-host-range"-Replikationsorigin vom Pseudomonas-Plasmid pVSI (Itoh et al. 1984); Amp ^r , Sm ^r , Sp ^r R. Deblaere, pers. Mitteilung
pGV941	wie pGV943, dazu das Kanamycinresistenzgen aus pKC7::nos (Deblaere et al. 1985) R. Deblaere, pers. Mitteilung

Tab. 2: Fortsetzung

Spezifikation	Referenz
<u>Agrobacterium tumefaciens</u>	
C58C1 C58-Derivat ohne Ti-Plasmid; Rif ^r	Van Larebeke et al. 1974
<u>Escherichia coli</u>	
BMH71-18 delta-(lac,pro), F' lac I ^q Z delta-M15 pro ⁺	Messing et al. 1977
H9101 Pro ⁻ Leu ⁻ His ⁻ lacY Sm ^r rK ⁻ mK ⁻	Boyer und Roulland-Dussoix 1969
GJ23 Helferstamm für den konjugativen Transfer von Plasmiden mit R64 ^{grd11} (tra-Funktion) und pGJ28 (mob-Funktion); Km ^r , Sm ^r , Tet	Van Haute et al. 1983
<u>Bakteriophagen</u>	
M13mp9 M13-Derivat mit einem Segment aus dem E. coli lacZ-Gen und einem "Polylinker"	Vieira und Messing 1982

Konzentrationen zur Selektion eingesetzter Antibiotika (in µg/ml)

Agrobacterium: Rif 100, Cb 100, Sp 100

E. coli: Amp 50, Sp 50, Km 25, Tet 10

2.3 Phytohormonbestimmung

2.3.1 Aufbau und Durchführung von Radioimmunoassays

Die Synthese von ZR-, iPAdo- und IES-Konjugaten und die Immunisierung von Kaninchen erfolgte wie beschrieben (Weiler 1980, 1981a, Weiler und Spanier 1981). ZR- und iPAdo-Tracer wurden in Abwandlung zur beschriebenen Methode in einem Versuchsansatz synthetisiert. Dazu wurden je 0.6 μMol ZR- und iPAdo-Dialdehyd mit $^3\text{H-NaBH}_4$ (New England Nuclear, 1.85×10^{10} Bq - 500 mCi, 2.37×10^{12} Bq/mMol = 64 Ci/mMol) in einem Gesamtvolumen von 0.4 ml zum entsprechenden Dialkohol reduziert. Zum Abfangen von überschüssigem $^3\text{H-NaBH}_4$ wurde 10 Min nach Reaktionsbeginn 30 μMol Retinal in Ethanol hinzugefügt und die Reaktion für 30 Min fortgesetzt. Nach Eindampfen des Reaktionsansatzes mit N_2 und Resuspendieren in H_2O wurde das entstandene Retinol mit Petrolether extrahiert. Die wässrige Phase wurde erneut zur Trockne eingedampft, in Ethanol aufgenommen und chromatographisch gereinigt (Kieselgel-Dünnschichtplatte ohne UV-Indikator, Macherey-Nagel, Düren; Laufmittel CHCl_3 :Methanol, 9:2). Die vom Chromatogramm separat eluierten Cytokinintracer wiesen eine spezifische Aktivität von $1.1\text{-}1.5 \times 10^{12}$ Bq/mMol (30-40 Ci/mMol) auf. Der Indolessigsäuretracer mit einer spezifischen Aktivität von 1.1×10^{12} Bq/mMol wurde von der Firma CEA, Frankreich bezogen.

Die Durchführung der Radioimmunoassays erfolgte wie bei Weiler (1980) beschrieben in 3 ml-Plastikreaktionsgefäßen. Cytokininantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:50000, Indolessigsäureantikörper von 1:200 eingesetzt. Die Empfindlichkeit war mit 50 %-Werten von 0.1-0.2 pMol/0.1 ml für beide Cytokinintests bzw. 2 pMol/0.1 ml für Indolelessigsäure sehr hoch. Die Sera zeigten Kreuzreaktionen, die den von Weiler (1980, 1981a) und Weiler und Spanier (1981) beschriebenen entsprachen.

2.3.2 Aufschluß von Pflanzenmaterial und Auswertung von RIA-Daten

Die Extraktion von Pflanzenmaterial für die Phytohormonbestimmung und die chromatographische Analyse der Verteilung von Cytokininderivaten in Rohextrakten erfolgte wie bei Weiler und Spanier (1981) beschrieben. Als Laufmittel für die Chromatographien wurde benutzt: A n-Butanol: NH_3 : H_2O , 6:1:2, obere Phase; B n-Butanol:Essigsäure: H_2O , 12:3:5. Für die Beta-Glucosidasebehandlung wurden 1-2 ml des Rohextraktes am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt (35 °C) und der Rückstand in 2 ml 50 mM Na-Acetat-Puffer (pH 5.0) aufgenommen. Der Ansatz wurde mit 2.5 Units Beta-Glucosidase aus Süßmandeln (Boehringer) bei 37 °C für 3 Stunden inkubiert, mit NaOH auf pH 8.0 eingestellt und dreimal mit je 3 ml wassergesättigtem Butanol extrahiert. Die Butanolphasen wurden vereinigt, am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand in 1 ml 50 % Ethanol resuspendiert und erneut chromatographiert.

Proben von Radioimmunoassays wurden in dem Szintillationszähler PW4700 der Firma Philips gemessen. Die Meßwerte wurden sofort von einem angeschlossenen Apple II-Computer übernommen und auf Disketten gespeichert. Zur on-line-Auswertung von Standardkurven und unbekannten Proben diente ein in der Computersprache Pascal geschriebenes Programm der Firma Nuclear Interface, Münster. Da dieses Programm nur von den einzelnen Extrakten unabhängige Auswerteergebnisse liefern konnte (Hormongehalt bezogen auf das eingesetzte Probenvolumen), wurde die weitere Umrechnung (Hormongehalt bezogen auf das Frischgewicht des extrahierten Pflanzenmaterials) mit Hilfe eines selbstgeschriebenen Pascalprogramms auf dem Apple II durchgeführt.

2.4 Klonierung von DNA

2.4.1 Phagen und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit zur Isolation und Klonierung von DNA-Fragmenten benutzten Ausgangsplasmide und Phagen sind in Tab. 2 aufgelistet. Darüberhinaus wurde ein mit dem Restriktionsenzym HaeII aus pUC19 (Vieira und Messing 1982) isoliertes, 439 bp großes DNA-Fragment (mit T4-DNA-Polymeraseverdauten, glatten Enden) von A. Simons-Schreier zur Verfügung gestellt, das das gesamte Alpha-Fragment des lacZ-Gens enthielt (siehe dazu 2.4.6).

2.4.2 Isolation von DNA

Die routinemäßige Isolation von Plasmid- oder doppelsträngiger Phagen-DNA aus 1-1.5 ml E. coli-Übernachtskultur wurde mit Hilfe der alkalischen Lyse, verändert nach Birnboim und Doly (1979), durchgeführt, wobei kein Lysozym, und EDTA anstelle von CDTA eingesetzt wurde. Darüberhinaus wurde vor der Ethanolfällung Protein durch einmalige Extraktion mit dem gleichen Volumen Phenol/CHCl₃ entfernt. Nach Zentrifugation, Alkoholfällung und Waschen wurde die getrocknete DNA in 30 µl TE-Puffer (pH 8; Maniatis et al. 1982) aufgenommen. Plasmid-DNA hatte hierdurch eine Konzentration von ca. 100 ng/µl, Phagen-DNA von ca. 40 ng/µl.

Für die Isolation einer großen Menge hochreiner Plasmid-DNA aus 500 ml E. coli-Übernachtskultur wurden die Bakterien mit Lysis-Mix aufgeschlossen (Rüther 1982). Nach dem Abzentrifugieren von Membran- und Chromosomentrümmern wurde die DNA durch zweimaliges Zentrifugieren in einem CsCl-Gradienten (0.97 g/ml CsCl, 140 µg/ml Ethidiumbromid; 1. Zentrifugation im Rotor VTi50 bei 45000 UPM, 2. Zentrifugation im Rotor VTi65 bei 60000 UPM) angereichert. Ethidiumbromid wurde durch 3-4-malige Extraktion mit H₂O-gesättigtem n-Butanol entfernt und die DNA zweimal bei 4 °C gegen jeweils 1 l TE-Puffer (pH 8) dialysiert. Anschließend wurde die DNA

zweimal mit Ethanol gefällt, gewaschen und nach dem Trocknen in 500 µl TE-Puffer (pH 8) aufgenommen. Die DNA hatte danach im allgemeinen eine Konzentration von 1-2 mg/ml.

2.4.3 Restriktionsverdauungen, Generierung von glatten DNA-Enden und Ligation von DNA

Die Verdauung von DNA mit käuflichen Restriktionsenzymen (Boehringer, Bethesda Research Laboratories, New England Biolabs oder Renner) erfolgte abhängig vom Enzym in einem von drei Verdauungspuffern (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT und 0, 50 bzw. 100 mM NaCl; bei 100 mM NaCl wurde 50 mM Tris-HCl eingesetzt; Maniatis et al. 1982). Verdauungen mit dem Enzym SmaI wurden in einem speziellen Sma-Puffer durchgeführt (15 mM Tris-HCl pH 8, 15 mM KCl, 6 mM $MgCl_2$, 6 mM DTT). Bei Doppel- oder Mehrfachverdauungen von DNA wurden alle Restriktionsenzyme in einem Reaktionsansatz benutzt. War dies aufgrund stark abweichender Puffer- oder Reaktionsbedingungen der Enzyme nicht möglich, erfolgte die Verdauung in zwei Schritten, wobei ggf. die NaCl-Konzentration des Verdauungsansatzes für die zweite Reaktion entsprechend angeglichen werden mußte. Die Reaktionen erfolgten im allgemeinen bei einer DNA-Konzentration von 10-200 µg/ml und einer Enzymkonzentration von 500-1000 Units/ml und wurden für 1.5-4 Stunden durchgeführt. Für die Verdauung von Rest-RNA in der DNA-Präparation wurde RNase A (Boehringer) in einer Konzentration von ca. 100 µg/ml zugesetzt; dies war bei Verdauung von hochgereinigter DNA nicht erforderlich.

War für DNA-Ligationen die Generierung von glatten Enden erforderlich, wurden 5'-überhängende DNA-Enden mit dem Klenow-Fragment der E. coli-DNA-Polymerase I (Boehringer; Endkonzentration 40 Units/ml) im oben beschriebenen Verdauungspuffer, der 50 mM NaCl enthielt, aufgefüllt, wobei gleichzeitig alle vier Nukleotide in einer Konzentration von etwa 20 µM eingesetzt wurden. 3'-überhängende DNA-Enden wurden mit T4-DNA-Polymerase (New England Biolabs; Endkon-

zentration ca. 40 Units/ml) im gleichen Puffer, aber 50 mM Tris-HCl, bei gleichzeitigem Einsatz aller vier Nukleotide in einer Konzentration von 10 μ M abgedaut.

Die Ligation von DNA erfolgte in jeweils frisch angesetzttem Ligasepuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM $MgCl_2$, 1.5 mM ATP, 10 mM DTT) bei 15 °C über Nacht. Vektor-DNA wurde im allgemeinen in einer Konzentration von 20 μ g/ml, einzuklonierendes DNA-Fragment in 3-5-fachem molaren Überschuß angeboten. T4-DNA-Ligase (Boehringer oder Pharmacia) wurde in einer Konzentration von 100-200 Units/ml eingesetzt. Bei Ligation von glatten Enden wurde einzuklonierendes DNA-Fragment in 5-10-fachem molaren Überschuß angeboten und die Ligasekonzentration auf 300-600 Units/ml erhöht.

2.4.4 Analytische und präparative Gelelektrophorese

Die Analyse von DNA erfolgte durch Verdauung mit Restriktionsenzymen und anschließender elektrophoretischer Auftrennung der Restriktionsfragmente auf einem horizontalen Agarosegel. Für die Elektrophorese wurde TBE-Puffer (pH 8) benutzt, dem Ethidiumbromid in einer Konzentration von 30 μ g/l zugegeben war (Maniatis et al. 1982). Unmittelbar vor dem Auftragen wurden die Proben mit einem Ficoll-Farbstoffgemisch versetzt (Endkonzentrationen: 1.5 % Ficoll, 0.01 % Bromphenolblau, 0.01 % Xylen Cyanol, 0.01 % SDS). Die Elektrophorese wurde im allgemeinen bei einer konstanten Stromstärke von 50-100 mA so lange durchgeführt, bis Bromphenolblau das Gelende erreicht hatte. Als Längenmarker für die Zuordnung von Fragmentgrößen wurde mit dem Restriktionsenzym PstI geschnittene Lambda-NIN5-DNA benutzt (DNA des Bakteriophagen Lambda mit der 2805 bp großen Deletion nin5; dadurch Deletion eines Teils des Gens ren und des Transkriptionsterminators t_{R2} zwischen den Genen P und Q, Hendrix et al. 1983; DNA von P.H. Schreier zur Verfügung gestellt). Im allgemeinen reichten 200 ng DNA pro Gelslot, um Fragmente von 300-500 bp Größe zu identifizieren.

Für die Isolation einzelner DNA-Fragmente aus einem Verdauungsansatz wurden die Proben in einer breiten Spur (im allgemeinen drei vereinigte Gelslots) auf ein Agarosegel aufgetragen und wie beschrieben aufgetrennt. Mit einem Skalpell wurden anschließend unter UV-Licht (366 nm) dicht vor und hinter den zu isolierenden DNA-Banden Schlitze quer zur Laufrichtung in das Gel geschnitten, in die trockenes DE81-Papier (Whatman) geschoben wurde. Dabei wurde die UV-Belichtung so kurz wie möglich gehalten, um UV-induzierte Veränderungen an der DNA zu verhindern. Die Elektrophorese wurde danach für weitere 30-45 Min fortgesetzt. Die vor den DNA-Banden positionierten DE81-Papierstreifen mit den anhaftenden DNA-Fragmenten (im UV-Licht rot fluoreszierender Belag) wurden anschließend in am Boden offene Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und die DNA durch jeweils viermaliges Durchzentrifugieren von je 100 µl Puffer I (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM Na-EDTA, 0.1 mM LiCl) bzw. Puffer II (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM Na-EDTA, 1 M LiCl, 20 % Ethanol) gewaschen und eluiert. Danach wurde die DNA mit Ethanol gefällt, gewaschen und nach dem Trocknen in wenig TE-Puffer (pH 8) resuspendiert (Volumen abhängig von gewünschter DNA-Konzentration).

2.4.5 Transformation von E. coli

Bei Transformationsansätzen wurden E. coli-Bakterien zunächst durch zweimaliges, kurzes Abzentrifugieren und Wiederaufnehmen in eiskaltem CaCl_2 (50 mM) für die DNA-Aufnahme kompetent gemacht. Nach einer Ruhephase von mindestens 30 Min auf Eis wurden die Bakterien mit Plasmid- oder Phagen-DNA für 30 bzw. 40 Min auf Eis inkubiert. Die DNA-Aufnahme erfolgte danach durch einen 3-minütigen Hitzeschock bei 42 °C. Plasmidtransformierte Bakterien wurden nach einer 45-minütigen Erholungsphase bei 37 °C auf antibiotikahaltigen, phagentransformierte Bakterien sofort nach dem Hitzeschock mit frischen Bakterien in NAS-Weichagar (8 g Nutrient Broth, 5 g NaCl, 6.5 g Agar pro Liter) auf antibiotikafreien YT-Agarplatten so ausplattiert, daß

Einzelkolonien bzw. -plaques bei 37 °C über Nacht wachsen konnten. Der Transformationserfolg wurde anhand der Kolonien- bzw. Plaquezahl pro µg eingesetzter DNA kontrolliert.

2.4.6 Isolation rekombinanter Plasmide und Phagen unter Ausnutzung der Alpha-Komplementation der Beta-Galaktosidase

Bei Klonieren von DNA in M13-Phagen, pUC-Plasmiden oder den im Verlauf der vorliegenden Arbeit weiterentwickelten binären T-DNA-Vektoren pSRB3 und pSRB4 konnte die Alpha-Komplementation der Beta-Galaktosidase ausgenutzt werden, um Transformanten, die möglicherweise die gewünschte rekombinante DNA enthalten, unmittelbar zu erkennen. Bei dieser Methode wird eine Mutation in der genkodierenden Region der Beta-Galaktosidase des Wirtsbakterienstamms (hier BMH71-18 mit der Mutation delta-M15, siehe Tab. 2) durch das lacZ_{alpha}-Fragment der eingebrachten DNA (M13 oder Plasmid; Messing et al. 1977) komplementiert (Alpha-Komplementation, Langley et al. 1975), so daß bei Einsatz des künstlichen Induktors Isopropylthiogalaktosid (IPTG) und des künstlichen Substrats 5-Brom-4-chlorindolyl-beta-D-galaktosid (X-Gal) ein blauer, unlöslicher Indigofarbstoff entsteht. Ist die genkodierende Region des lacZ_{alpha}-Fragments der transformierten DNA durch eine Insertion unterbrochen, kann keine funktionsfähige Beta-Galaktosidase synthetisiert werden; die Plaques oder Bakterienkolonien bleiben weiß. Um die beschriebene Methode anwenden zu können, wurden die Bakterien nach der Transformation mit DNA auf Agarplatten, die IPTG (100 µM) und X-Gal (20 µg/ml) enthielten, ausplattiert. Transformanten, die die gewünschten DNA-Konstrukte enthielten, wurden durch Analyse von weißen Einzelplaques bzw. -kolonien isoliert.

2.4.7 DNA-Verdauung mit der Exonuklease Bal31

Die Bal31-Verdauung von linearisierter DNA erfolgte wie bei Maniatis et al. (1982) beschrieben, jedoch in einem Puffer mit der 3-fachen NaCl-Konzentration. Für die Verdauung von 10 µg DNA in einem Volumen von 50 µl wurden 2.5 Units Bal31 (Boehringer) eingesetzt. Aliquots von je 10 µl wurden 1.5 Min nach Reaktionsbeginn im Abstand von 75 Sek entnommen und die Reaktion sofort in Phenol/Chloroform gestoppt. Nach Fällern, Waschen und Trocknen wurde die DNA in je 20 µl H₂O aufgenommen.

2.4.8 Linkerphosphorylierung

Die Phosphorylierung von 2.5 nMol BglII-Linker (New England Biolabs; d-(CAGATCTG)) erfolgte nach einer Methode von Chaconas et al. (1975). Radioaktives Gamma-³²P-ATP (Amersham; 3.7×10^8 Bq/ml = 10 mCi/ml) hatte eine spezifische Aktivität von $>1.85 \times 10^{14}$ Bq/mMol = 5000 Ci/mMol. Die Reinigung des Versuchsansatzes erfolgte über eine Sephadex-6-50-Säule in 10 mM (NH₄)HCO₃. Zwölf Fraktionen (aus dem Bereich des Anstiegs der eluierten Radioaktivität) wurden vereinigt, lyophilisiert und der Linker in 100 µl H₂O aufgenommen.

2.4.9 Isolation und Sequenzierung von einzelsträngiger Phagen-DNA

Für die Isolation von einzelsträngiger M13-DNA wurden Phagen aus 1 ml eines klaren Lysats mit PEG 6000 (4 %) und NaCl (0.5 M) gefällt und in TE-Puffer (pH 8) aufgenommen. Nach Aufschluß der Phagen mit Phenol und Chloroform wurde die DNA mit Ethanol gefällt, gewaschen und in 15 µl TE-Puffer (pH 8) resuspendiert. Diese Menge Einzelstrang-DNA reichte im allgemeinen für fünf Sequenzierungsreaktionen aus.

Die Sequenzierung von DNA erfolgte mit Hilfe einer modifizierten Strangabbruchmethode nach Sanger et al.

(1977). Dazu wurde einzelsträngige M13-DNA mit einem synthetischen Sequenzierungsprimer (15-mer; Bethesda Research Laboratories) hybridisiert und die Reaktion unter Einsatz von Alpha-³⁵S-dATP (Amersham, $>2.22 \times 10^{13}$ Bq/mMol = 600 Ci/mMol, 3.7×10^7 Bq/ml = 1 mCi/ml) anstelle von ³²P-dATP wie beschrieben fortgesetzt. Die Auftrennung der radioaktiven DNA-Fragmente erfolgte auf einem 6 %-igen, denaturierenden Polyacrylamidgel in TBE-Puffer (24 g Harnstoff, 6 ml 50 % Polyacrylamid/Bisacrylamid (19:1), 5 ml 1xTBE pH 7.5, 2.2 ml 1.6 % Ammoniumpersulphat, ad 50 ml; 30 µl TEMED unmittelbar vor dem Gießen). Bei der anschließenden Autoradiographie wurden Röntgenfilme der Firma Kodak (XOMAT-S oder XAR) benutzt, die bei -70 °C über Nacht exponiert wurden.

2.5 Isolation von Agrobacterium-Mutanten

Der konjugative Transfer von Plasmiden aus E. coli nach Agrobacterium tumefaciens erfolgte mit Hilfe des E. coli-Helferstamms GJ23 (siehe Tab. 2) nach der Methode von Van Haute et al. (1983). Agrobacterium-Mutanten mit den gewünschten Plasmidkombinationen wurden durch mehrmaliges Ausstreichen von Einzelkolonien auf antibiotikahaltigen YT-Agarplatten und Selektion auf Opine-Minimalplatten (BTB-Medium, Hooykaas et al. 1979) gereinigt.

2.6 Inokulation von Nicotiana tabacum mit Agrobacterium tumefaciens

Für in vivo-Experimente wurden acht Wochen alte Tabakpflanzen der Varietät Xanthi im Gewächshaus mit verschiedenen Agrobacterium-Mutanten inokuliert. Dazu wurden die Stängel im Bereich der Internodien 5-7 mit Zahnstochern verletzt und mit Bakterien infiziert, welche zuvor zwei Tage auf YEB-Agarplatten gewachsen waren. Die Tabakpflanzen wurden anschließend bis zur Extraktion im Gewächshaus belassen.

Bei in vitro-Experimenten wurden Blattscheiben von acht Wochen alten, unter Sterilbedingungen angezogenen Tabakpflanzen der Varietät Petit Havana "SR1" mit einem Korkbohrer (0.6 cm Durchmesser) ausgestanzt und auf MS_S -Medium überführt (physiologische Oberseite oben; je acht Scheiben pro 9-cm-Petrischale), welchem je nach Experiment BAP in verschiedenen Konzentrationen zugefügt war. Sofort anschließend wurden die Blattscheiben mit je 20-30 μ l einer bis zur späten log-Phase gewachsenen Agrobacterium-Kultur inokuliert und für 48 Stunden unter den bei 2.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Für Koinokulationen wurden Flüssigkulturen der Bakterien im Verhältnis 1:1 gemischt. Nach zwei Tagen wurden die Blattscheiben auf der Ober- und Unterseite weitgehend von Bakterien befreit und auf frisches Medium überführt, dem das Antibiotikum Claforan (Hoechst, Frankfurt) in einer Konzentration von 500 mg/l zugesetzt war. Die Weiterkultivierung erfolgte wie unter 2.1 beschrieben.

2.7 Biochemischer Nachweis transgener Pflanzen

Transformierte Pflanzen wurden aufgrund der Aktivität der mit der T-DNA eingebrachten Markergene nos und nptII identifiziert. Der Enzymtest für Nopalinsynthase erfolgte nach der Methode von Otten und Schilperoort (1978). Neomycinphosphotransferase wurde wie bei Schreier et al. (1985) nachgewiesen.

2.8 Isolation, Reinigung und Analyse einer unbekannten, fluoreszierenden Substanz

Für die Isolation und Reinigung einer bisher unbekannten, fluoreszierenden Substanz wurden 10 g Blattmaterial in 40 ml Methanol bei Raumtemperatur zermörserst und für 25 Min bei 5000 UPM zentrifugiert (Minifuge, Heraeus). Nach Eindampfen des Überstands am Rotationsverdampfer bei 35 °C wurde der Rückstand in 2 ml Methanol resuspendiert, im Verhältnis 1:10

mit H_2O verdünnt und über Glaswolle mehrmals filtriert, bis eine klare Lösung vorlag. Der Extrakt wurde danach in Portionen zu 4 ml auf eine mit 15 ml Methanol, 30 ml 10 % Methanol und 30 ml H_2O vorbehandelte Superclean-Säule (LC-18, 6 ml = 1.0 g; Supelco Inc., Bellefonte, Pennsylvania) aufgetragen, wobei jeweils mit 4 ml H_2O nachgewaschen wurde. Die im UV-Licht (366 nm) hellblau fluoreszierende Substanz wurde anschließend mit einem Stufengradienten von 5-60 % Methanol in H_2O (5 % Zunahme der Methanolkonzentration pro Stufe; 4 ml pro Stufe) eluiert und fraktionsweise gesammelt. Die Fraktionen aus dem Bereich 15-40 % Methanol wurden vereinigt, am Rotationsverdampfer bei 35 °C zur Trockne eingeengt und der Rückstand in 500 µl 20 % Methanol resuspendiert.

Die weitere Reinigung erfolgte mit Hilfe einer C18-HPLC-Säule (Reverse Phase; 250x10 mm²; Ultrasphere QDS; 5 µm Partikelgröße; Beckman) bei Raumtemperatur (Injektorschleife: 100 µl; Detektor: 280 nm oder 370 nm; Absorptionsbereich: 0.64 oder 1.28). Die Substanz wurde mit einem linearen Gradienten von 10-60 % Methanol (Puffer A: 10 % Methanol in 20 mM KH_2PO_4 , pH 5.6; Puffer B: 60 % Methanol in H_2O ; Anstieg in 30 Min; 66-93 bar) bei einer Fließrate von 1.5 ml/Min eluiert und in Fraktionen zu 1.5 ml gesammelt. Fraktionen aus dem Bereich 86-88 % Puffer B (entspricht 51 % Methanol) mit der im UV-Licht fluoreszierenden Substanz (max. zwei Fraktionen; bei keiner weiteren Fluoreszenz festzustellen) wurden vereinigt und mit N_2 zur Trockne eingedampft. FAB-Massen- (Fast Atom Bombardment) und Kernspinresonanzspektren (¹H-NMR) wurden am Institut für org. Chemie, Universität Köln, und Institut für Spektrochemie, Dortmund, angefertigt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Phytohormonbestimmung in Crown Gall Tumorgeweben von Nicotiana tabacum

3.1.1 Cytokiningehalt von in vitro-Zelllinien

Für die Bestimmung von Cytokiningehalten in Tabak-Sterilkulturen wurden die in Tab. 1 bezeichneten Sproß- und Kalluslinien von Nicotiana tabacum verwandt. Die Kulturen NW und 1A6 wuchsen unorganisiert und flockig-braun, während bei 1GV2100, 1GV2206 und 1GV2219 grüne Kallusse mit Sproßbildung vorlagen. Abbildung 4 zeigt als Beispiel die Kulturen NW und 1GV2219 etwa 3 Wochen nach der Subkultivierung auf frisches Medium. Von der Sproßkultur 1SR1 wurde Blattmaterial als Kontrolle analysiert. Von allen Kulturen wurden etwa 0.5-1 g Pflanzenmaterial zu unterschiedlichen Zeiten nach der Subkultivierung entnommen und wie unter 2.3.2 beschrieben extrahiert. Cytokinine vom ZR- und iPAo-Typ wurden anschließend mit Hilfe von Radioimmunoassays im Rohextrakt gemessen. Die Ergebnisse einer Meßreihe sind in Tab. 3a und 3b dargestellt. Es zeigt sich, daß der Cytokiningehalt bezogen auf das Frischgewicht bei allen transformierten Kalluskulturen innerhalb der ersten 10 Tage nach der Subkultivierung ansteigt, danach jedoch wieder abnimmt (Ausnahme ist hier der iPAo-Gehalt bei 1GV2219, der nach 15 Tagen höher als nach 10 Tagen ist). Dieses Verhalten ist auch bei NW, hier jedoch nur bei Cytokinin vom ZR-Typ zu beobachten, während 1SR1 konstante oder unregelmäßig schwankende Werte zeigt. Im allgemeinen hat die Kultur 1A6 einen etwa 10-fach höheren Gehalt an Cytokinin vom ZR-Typ als die habituierte Linie NW. In allen Fällen zeigen die "shooter"-Linien nochmals um den Faktor 4-20 erhöhte Meßwerte bei diesem Cytokinityp. Die Meßwerte für den iPAo-Typ sind allgemein niedriger als die für den ZR-Typ.

Tab. 3a: Cytokinine vom Zeatinribosidtyp in Sterilkulturen von *Nicotiana tabacum*. Angegeben ist der Cytokinin-gehalt im Rohextrakt in pMol/g Frischgewicht für verschiedene Zelllinien in Abhängigkeit von der Zeit in Tagen nach dem letzten Subkultivieren

Kultur	Zeit nach Subkultivierung in Tagen				
	5-7	10	15	20	30
1SR1	30.5	7.5	37.4	37.2	nd
NW	20.0	41.9	24.4	8.3	nd
1A6	20.4	485	193	nd	51.4
1GV2100	1126	1804	1400	984	nd
1GV2206	910	1255	723	nd	387
1GV2219	305	582	418	187	nd

Tab. 3b: Cytokinine vom Isopentenyladenosintyp in Sterilkulturen von *Nicotiana tabacum*. Angaben siehe Tab. 3a

Kultur	Zeit nach Subkultivierung in Tagen				
	5-7	10	15	20	30
1SR1	47.3	16.5	18.1	8.4	nd
NW	4.0	13.2	7.3	12.9	nd
1A6	15.6	76.4	18.6	nd	7.0
1GV2100	24.5	199	50.8	19.9	nd
1GV2206	28.3	46.4	27.5	nd	14.8
1GV2219	8.0	23.0	30.2	8.0	nd

nd = nicht durchgeführt

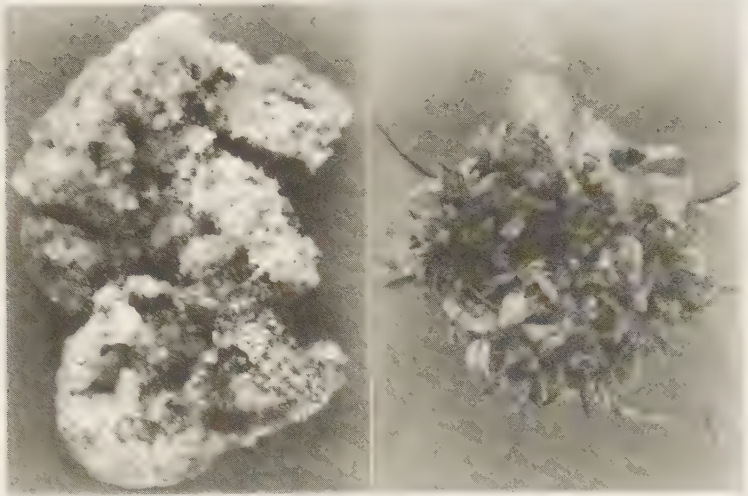


Abb. 2. Habitus von in vitro-Kulturen von Nicotiana tabacum. Dargestellt sind die hormonautotrophe Tabaklinie NW (links) und die "shooter"-transformierte Linie 1GV2219, 3 Wochen nach der Subkultivierung auf hormonfreies MS_S-Medium

3.1.2 Hormonveränderungen bei der Tumorentwicklung in vivo

3.1.2.1 Zeitlicher Verlauf

Acht Wochen alte Pflanzen von Nicotiana tabacum var. Xanthi wurden mit verschiedenen Agrobacterium-Stämmen im Gewächshaus inokuliert. Dazu wurden die "shooter"-Mutanten C58C1(pGV2215) und C58C1(pGV2219) sowie die "rooter"-Mutante C58C1(pGV2250) benutzt (siehe Tab. 2). Als Kontrolle dienten die plasmidlosen Bakterien C58C1 und der wildtypähnliche Stamm C58C1(pGV2208), bei dem nur das Octopingen 3 der T-DNA deletiert ist. Weitere Tabakpflanzen wurden verwundet, nicht jedoch infiziert. Bei allen Pflanzen zeigte sich nach wenigen Tagen eine schwache Kallusbildung an den Wundstellen. Nach etwa 12 Tagen konnte eine leichte, nach 15-18

Tagen eine verstärkte Tumorbildung nur bei den Pflanzen beobachtet werden, die mit virulenten Bakterien inokuliert waren. Sproßbildung trat bei den "shooter"-transformierten Tumoren nach etwa 60-70 Tagen auf, wohingegen Wurzelbildung im Fall von C58C1(pGV2250) auch nach 13 Wochen nicht beobachtet werden konnte. Die Abb. 5 zeigt C58C1(pGV2215)-infi-zierten Tabak 9, 16, 49 und 80 Tage nach der Inokulation.

Über einen Zeitraum von 7 Wochen wurden in regelmäßigen Abständen von je drei Pflanzen eines Inokulationsansatzes Proben entnommen und wie in 2.3.2 beschrieben in einem Extrakt vereinigt. Dabei wurden aus den Stengeln kleine, quaderförmige Blöckchen geschnitten, in deren Mitte der Wundkanal verlief, während der Rest der Pflanzen verworfen wurde. Auf diese Weise konnte der Anteil der potentiell transformierten Zellen in allen Extrakten sehr hoch gehalten werden. Da die Tumoren im Verlauf des Beobachtungszeitraums immer mehr verholzten, war eine Probenentnahme zum Zeitpunkt der Sproßbildung der "shooter"-transformierten Gewebe nicht mehr möglich. Zwei bis vier Tage nach der Probenentnahme wurden der Cytokinin- und Auxingehalt im Rohextrakt mit Hilfe von Radioimmunoassays gemessen.

Abbildung 6 zeigt die Konzentration von Cytokinin des ZR-Typs im Verlauf der Meßperiode. Aus der Abbildung ist zu ersehen, daß die uninfi-zierten und C58C1-inokulierten Kontrollen eine während der gesamten Zeit nahezu konstante Konzentration von 10-20 pMol/g Frischgewicht aufweisen. Das gleiche Verhalten zeigen auch die C58C1(pGV2250)-inoku-lierten Pflanzen. Im Gegensatz dazu steigt die Cytokininkon-zentration im Fall der C58C1(pGV2208)-, C58C1(pGV2215)- und C58C1(pGV2219)-transformierten Pflanzen kurz vor Erscheinen der ersten äußeren Anzeichen der Tumorbildung stark an und ist danach etwa um den Faktor 10 höher als bei den nichtinfi-zierten Kontrollen. Nach etwa 30-35 Tagen zeigen die "shooter"-inokulierten Pflanzen einen erneuten Anstieg, so daß 6-7 Wochen nach der Inokulation bei diesen Tumoren eine etwa 100-1000-fach erhöhte Cytokininkonzentration gegenüber den nichtinfi-zierten Kontrollen festzustellen ist.

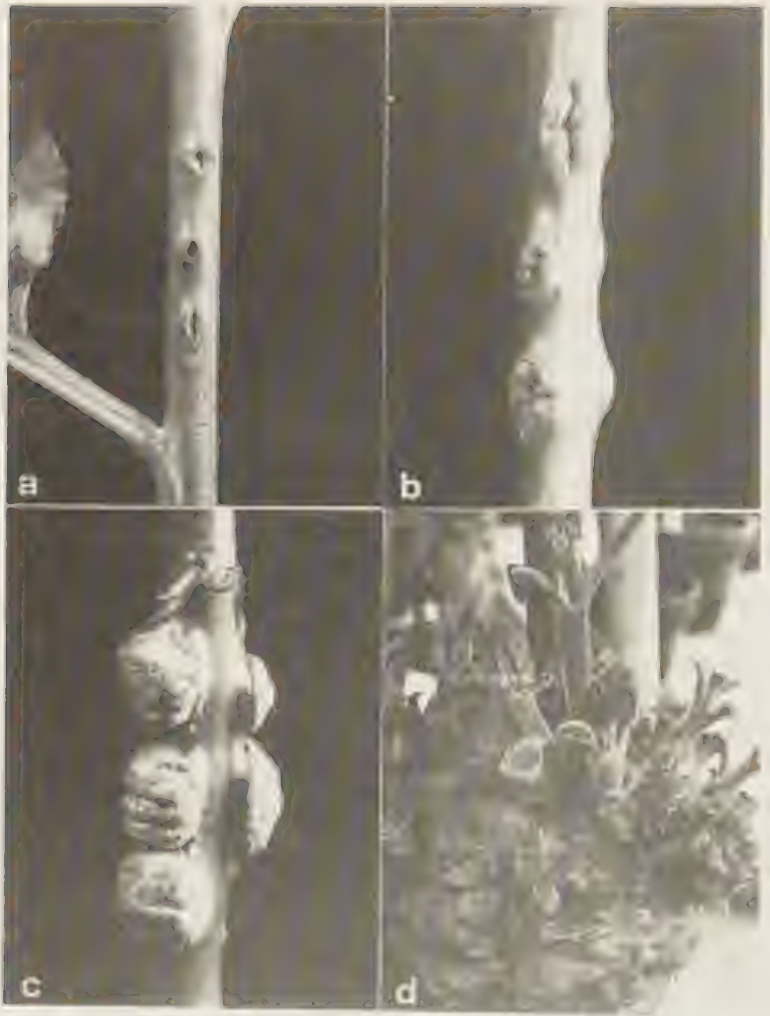


Abb. 8: Tumorentwicklung bei "shooter"-transformierten Pflanzen von *Nicotiana tabacum*. Dargestellt ist die Entwicklung 9 (a), 16 (b), 49 (c) und 80 (d) Tage nach der Inokulation von Tabakpflanzen der Varietät Xanthi mit der *Agrobacterium tumefaciens*-Mutante C58C1(pGV2215). Nach 9 Tagen sind nur normale Wundreaktionen zu beobachten, während nach 16 Tagen eine deutliche Tumorbildung eingesetzt hat. Sproßbildung trat nach 60 Tagen auf

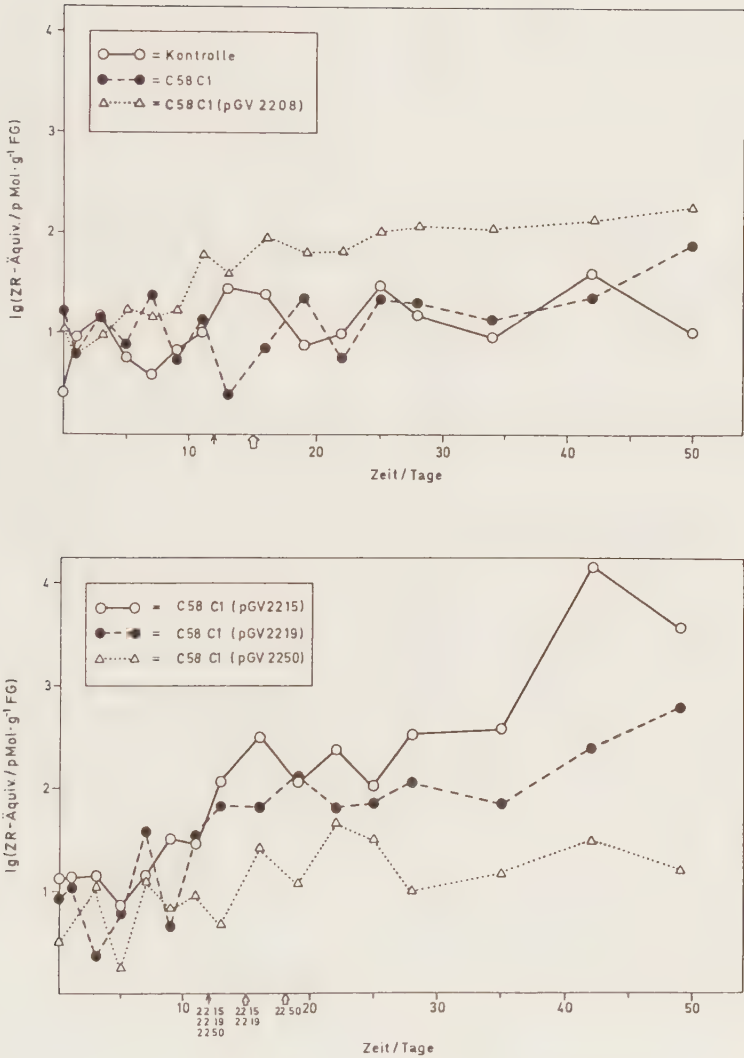


Abb. 6: Cytokinine während der Entstehung von Crown Gall Tumoren bei *Nicotiana tabacum*. Dargestellt ist die zeitabhängige Konzentration von Cytokinin des ZR-Typs in Pflanzen, die mit verschiedenen Stämmen von *Agrobacterium* inokuliert wurden. Kontrollen wurden verwundet, nicht jedoch infiziert. Pfeile an der Zeitachse deuten das Auftreten von leichten bzw. stärker werdenden Anzeichen der Tumorentwicklung an

Cytokinine vom iPA_{Do}-Typ zeigten in allen Fällen eine gleichbleibende Konzentration von etwa 10 pMol/g Frischgewicht. Parallel zu Cytokinin wurde in den Extrakten die Auxinkonzentration gemessen. Nur in "rooter"-inokulierten Geweben wurde hierbei nach 25-30 Tagen ein Anstieg auf 4-5 nMol/g Frischgewicht beobachtet. In allen übrigen Fällen blieb die Konzentration im Bereich der uninfigzierten Kontrollen (0.5-1 nMol/g Frischgewicht). In Abb. 7 ist der zeitliche Verlauf des Verhältnisses von Cytokinin des ZR-Typs zur Auxinkonzentration dargestellt. Dieses Verhältnis nimmt bei "rooter"-transformierten Tumoren auf Werte von 0.005-0.01 ab, während bei beiden "shooter"-Mutanten ein starker Anstieg auf etwa 2-8 zu beobachten ist. Die C58C1(pGV2208)-inokulierten Kontrollen weisen einen leichten Anstieg auf Werte von 0.2-0.3 auf. Die übrigen Kontrollen zeigen im gesamten Zeitraum ein konstantes, leicht schwankendes Cytokinin/Auxin-Verhältnis von etwa 0.05-0.2.

3.1.2.2 Verteilung von Cytokininderivaten

Extrakte von C58C1(pGV2215)-infizierten Gewebeproben, die 9, 16 und 49 Tage nach der Inokulation entnommen waren, wurden auf Dünnschichtplatten chromatographiert und fraktionsweise eluiert. In den Eluaten wurde der Cytokiningehalt (ZR-Typ) bestimmt. Alle Chromatogramme zeigten Wiederfinderaten von 80-90 % im Vergleich zum eingesetzten Extrakt. Abbildung 8 zeigt das Ergebnis der Messungen, wobei kein Ausgleich für verschiedene Kreuzreaktionen der Substanzen gegenüber dem Antikörper vorgenommen wurde. Neun Tage nach der Inokulation tritt nur ein meßbares Cytokininderivat auf, das mit authentischem Zeatinribosid cochromatographiert. Dagegen ist bei den 16- und 49-Tage-Extrakten ein prozentual zunehmender Anteil kreuzreagierender Substanz zu beobachten, die in dem verwandten Laufmittel A (siehe 2.3.2, Abb. 8) am Startpunkt verbleibt, also einen polaren Charakter aufweist. Der Anteil von Zeatin nimmt ebenfalls zu, bleibt jedoch prozentual gering. Im 49-Tage-Extrakt treten weitere Substanzen auf, für die keine Referenz zur Verfügung stand.

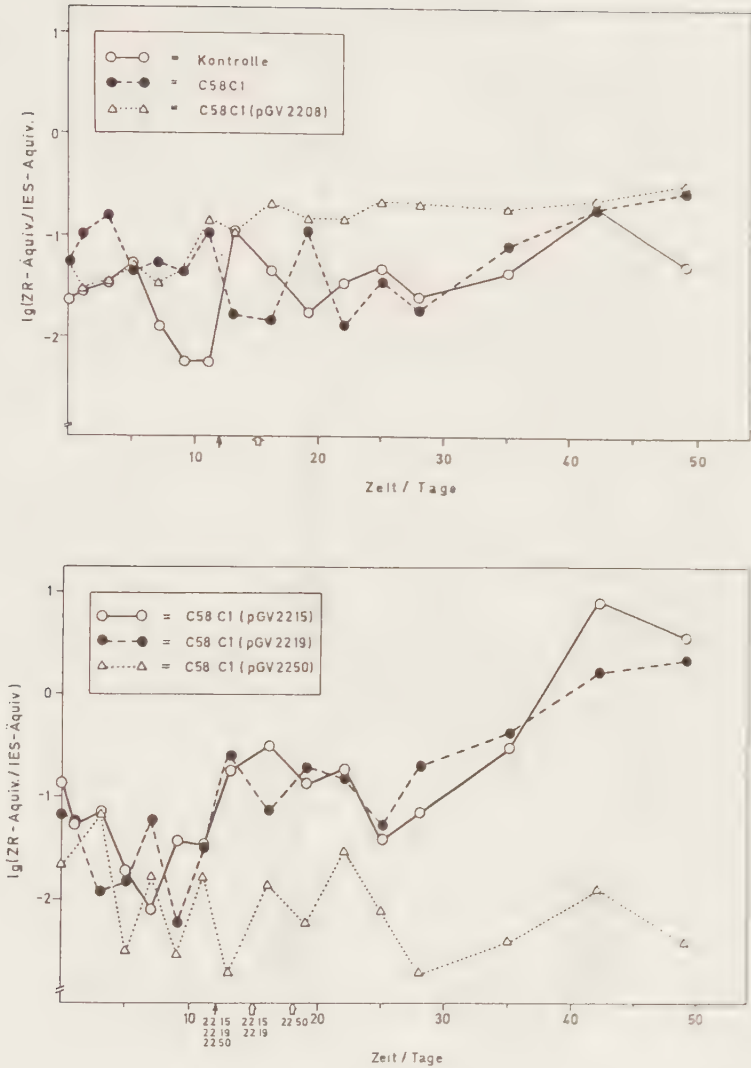


Abb. 7: Cytokinin/Auxin-Verhältnis bei Crown Gall Tumoren von *Nicotiana tabacum*. Wiedergegeben ist das Verhältnis von Cytokinin des ZR-Typs zu Auxin in Abhängigkeit von der Zeit. Die Ordinate ist logarithmisch geteilt. Pfeile an der Zeitachse symbolisieren das Auftreten von leichten bzw. stärker werdenden Anzeichen der Tumorentwicklung.

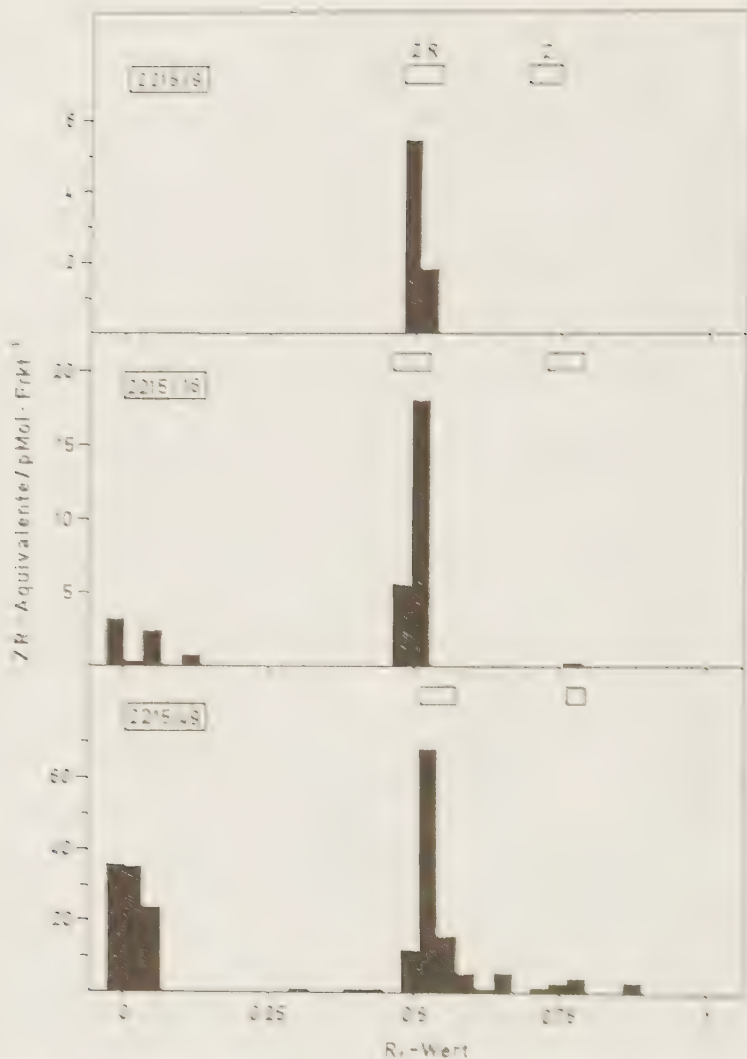


Abb. 5: Verteilung von Tetraäthylzirkon im Schmelzflußpolymer nach Ausfällung. Polymer 2212 und 2215 (oben) waren mit dem "normalen" Polymer 2217 (unten) verglichen und im verschlissenen Zustand zur Ionenaustauschchromatographie (Dünnschichtplatte) aufgetragen. Polymer 2212: 100% MgCl_2 und 100% ZrCl_4 ; Polymer 2215: 100% MgCl_2 und 100% ZrCl_4 ; Polymer 2217: 100% MgCl_2 und 100% ZrCl_4 . Die Verteilung von Tetraäthylzirkon im Schmelzflußpolymer ist in der Abbildung dargestellt. Die Verteilung von Tetraäthylzirkon im Schmelzflußpolymer ist in der Abbildung dargestellt.

3.2 Isolation und Klonierung von T-DNA-Genen

Um die bislang unbekannte Funktion von T-DNA-Gen 6b und die mögliche Interaktion mit Cytokinin analysieren zu können, wurden Experimente gemäß der folgenden, allgemeinen Arbeitsstrategie durchgeführt:

1. Isolation der Gene 6b und 4 aus der T-DNA und Überführen in ein zum Klonieren geeignetes E. coli-Vektorsystem (entsprechende Plasmide, die Teile der T-DNA mit den Genen 1, 4, 6a, 6b und 3 enthielten, wurden für die Arbeit zur Verfügung gestellt).
2. Ersetzen des Gen 6b-Promotors durch einen vergleichsweise stärkeren Promotor der T_R -DNA eines Ti-Plasmids vom Octopintyp.
3. Einklonieren der Gene 4 und 6b (ohne, mit T-DNA-eigenem oder T_R -DNA-Promotor) in die T-DNA eines in E. coli und Agrobacterium eigenständig replizierfähigen binären Vektors in verschiedenen Kombinationen.
4. Rückführen der T-DNA-Konstruktionen aus E. coli in einen Agrobacterium-Stamm, der auf einem T-DNA-freien Ti-Plasmid vom Octopintyp die Gene der Virulenzregion für den Transfer der eingebrachten T-DNA in die Pflanze zur Verfügung stellt.
5. Überführen von Gen 6b unter Kontrolle des T_R -DNA-Promotors in die T-DNA eines Ti-Plasmidvektors vom Nopalintyp, um die Funktion des Gens im Zusammenwirken mit Gen tzs analysieren zu können.
6. Einsatz der erzeugten Agrobacterium-Mutanten in ein geeignetes Pflanzensystem und Analyse der physiologischen Wirkung von Gen 6b.

3.2.1 Klonieren der Gen 6b-kodierenden Region hinter den $1'$ -Promotor der T_R -DNA

3.2.1.1 Struktur der T_L -DNA eines Ti-Plasmids vom Octopintyp und des Gens 6b

Als Ausgangsmaterial für die Klonierung der T-DNA-Gene 6b und 4 dienten die in Tab. 2 aufgelisteten E. coli-Plasmide pHD103 und pGV0507. Diese Plasmide enthalten je einen Teil

der T_L -DNA des Octopin-Ti-Plasmids pTiAch5. Die T_L -DNA eines Octopin-Plasmids ist in Abb. 9 schematisch dargestellt. Die Abbildung zeigt die einzelnen Gene der T-DNA und die für die vorliegende Arbeit relevanten Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme in diesem Bereich.

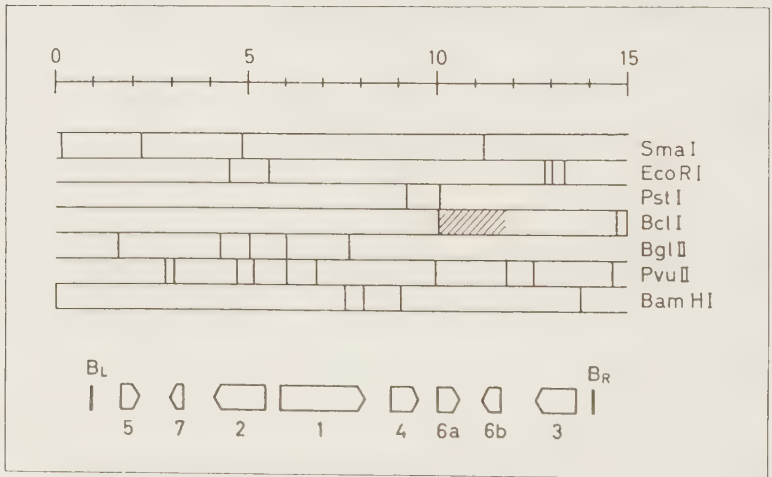


Abb. 9: Schematische Darstellung der T_L -DNA eines Ti-Plasmids vom Octopintyp. Wiedergegeben sind die acht Gene der T-DNA und deren Transkriptionsrichtung. Die Restriktionskarte zeigt einige der wichtigen Schnittstellen in der T-DNA. Das für das Ersetzen des Gen 6b-Promotors benötigte BclI/PvuII-Fragment ist durch Schraffur hervorgehoben. Die Skalierung gibt die Länge der T-DNA in Kilobasen an (B_L, B_R = linke und rechte T-DNA-Border)

Die kodierende Region des T-DNA-Gens 6b besteht aus 501 bp, was einem Protein von 167 Aminosäuren entspricht. Dieser Region geht eine DNA-Sequenz voraus, die einem eukaryontischen Promotor entspricht (zum allgemeinen Aufbau eines eukaryontischen Promotors siehe Lewin 1985). So sind die Hogness- (5'-TATAAAA-3') im Abstand von etwa 55 bp sowie zwei potentielle CAAT-Boxen (5'-CCAAT-3' und 5'-TCAATCT-3') im Abstand von etwa 85 bzw. 120 bp vom Startcodon zu finden. In der 3'-untranslatierten Region ist ein Polyadenylierungssignal (5'-AAATAAA-3') im Abstand von etwa 215 bp zum Stopcodon vorhanden. Abbildung 10 zeigt die Nukleotidsequenz von Gen 6b mit den genannten Kontrollstrukturen.

```

5'-CAGCTGAAAA TTCAAACGCG CTAGTCAATG CTATCAATCT GTCGTGTTCA
CACGGCATCA AACGGTCACC AATGACGTCA ATGGGCTTCC TTAGTCAATA
TAAAAACCAA CGGCTCAGAC TTACCAGCGG CAGGTATTG TAGTACATCC
AACACTGCG

ATG ACG GTA GCT AAT TGG CAG GTT CGA GAT TTG ACG CTT ATC
CTG CGC ACC GGC GAG ATG AAG AGT CGC TTG GAA CAG GCG AGA
ACG GAT TTC GGA GCG TTA CTG TCC GAA ACT GTA TAC TTT CAG
CCT TCC GCG ATT AGA CTT GGT GAG TTT GAT GAC GAG TAC ATC
CAC TCT CGA CAA GAG CTG GTC TAT GTA TAC CTT CGT GAA GAT
ATT GCA CGC CAA TGC GCC TTG CGT CGA AAC CTA CCG TCC AAC
TCC TCT AAC TTC GGA ACA ATG GCA ACT GCA ATA CCG CCG TGG
CTG ATG AAT GCA CGC AGC CTG AAT CGA GTT ATG CAG GAA AGG
TGC GAT CAA GGT GGC CTC GTC AAC TAC TAT CAA GGC CCA CAT
ACA AAT CAG TTC TTT TTG GCG ATT ATG CCA AGC AAC TGC TTT
GTT CGG TTC GGG ACC GAC ATA ATC AAC AAT GAA AAC TAC GGT
TTT AAG CCC GGG GAG GAA TAC ACT AGA GGA AGG AGA AGA

TGACGACGAT GAGATGGACG ATGAAGGGGA GGCTGGTGGA GCGGAACCAA
GAGAGTGTC AATCGGAAAC CTTATCAATT ATCCGATCAT TGCTTTAGGG
TCATGCGATC TTTCCGCATA ATCCCGGCG CCGACACCTA ATAAAGTCGG
CTAATCTATG TGATTGAGTG TGTCTTGACT TGTGTTTCTT GCATGTTTCC
AATGTCATTT AGTAACGAAA TAAACGTTAT CCTCTTCTAA AAGCAGGCTG
TGTTTTCGGC AAACATCGCC ACCCATCGCT AGTTTTTCTA AAAGTGTCT-3'

```

Abb. 10: Nukleotidsequenz von T-DNA-Gen 6b. Die kodierende Region ist in Form von Tripletts dargestellt. In der Promotor- (oben) und 3'-untranslatierten Region (unten) sind mögliche CAAT- und Hognessboxen sowie ein Polyadenylierungssignal stark hervorgehoben. Unterstrichen sind eine PvuII-Schnittstelle in Position 1-6 der Sequenz und eine SmaI-Schnittstelle am 3'-Ende innerhalb der kodierenden Region sowie "CAG"-Sequenzen in der Nähe des Startcodons (siehe 3.2.1.2; nach Barker et al. 1983)

3.2.1.2 Klonierungsstrategie zum Erzeugen einer promotor- losen Gen 6b-Konstruktion

Um die vorhandene Promotorsequenz durch eine andere ersetzen zu können, bedarf es unmittelbar vor der genkodierenden Region der Schnittstelle eines geeigneten Restriktions-
enzym. Da bei Gen 6b eine solche Schnittstelle nicht vorhanden ist, mußte sie künstlich geschaffen werden. Zu diesem Zweck wurde die folgende Strategie ausgearbeitet:

1. Subklonieren eines Teils der T-DNA aus pHD103, der das komplette Gen 6b sowie das 3'-Ende von Gen 6a enthält, in ein anderes E. coli-Plasmid.
2. Aufschneiden des Plasmids vor dem Gen 6b-Promotor und Abverdauen der Promotor-DNA mit der Exonuklease Bal31. Dabei sollen unter anderem DNA-Moleküle entstehen, die an ihrem "6b"-Ende die Sequenz 5'-CAG-3' aufweisen. In unmittelbarer Nähe des Startcodons ist diese Dreiersequenz dreimal vor (Abstand 26, 32 und 41 bp zum Startcodon) und dreimal innerhalb der genkodierenden Region (Abstand 15, 72 und 120 bp zum Startcodon) vorhanden. Diese Positionen sind in Abb. 10 durch Unterstreichen hervorgehoben.
3. Recircularisieren des Plasmids in Anwesenheit eines BglII-Linkers (5'-CAGATCTG-3'; synthetisches Oligonukleotid, das im Zentrum die Erkennungssequenz AGATCT des Restriktionsenzym BglII hat), so daß Linkermoleküle zwischen den zusammenkommenden Enden der Plasmidmoleküle eingebaut werden. Wird hierbei ein Linkermolekül an ein Bal31-verdautes DNA-Molekül ligiert, das die endständige Sequenz 5'-CAG-3' aufweist, entsteht eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym PstI (5'-CTGCAG-3'). Dieses Molekül ist durch entsprechende Verdauungen mit Restriktionsenzymen eindeutig zu identifizieren.
4. Umklonieren der Gen 6b-kodierenden Region mit Hilfe der neuen PstI-Schnittstelle in andere geeignete Vektorsysteme von E. coli. Durch eine entsprechende Wahl der Vektoren können verschiedene zusätzliche Restriktionsschnittstellen unmittelbar vor der kodierenden Region von Gen 6b erhalten werden, die weitere Klonierungsarbeiten erleichtern.

3.2.1.3 Entfernen des Gen 6b-Promotors

Das komplette T-DNA-Gen 6b wurde durch Verdauung von pHD103 (siehe Tab. 2) mit den Restriktionsenzymen BclI (Schnittstelle innerhalb der kodierenden Region von Gen 6a, ca. 70 bp hinter dem Startcodon) und PvuII isoliert (siehe Abb. 9 und Abb. 10) und in BamHI/SmaI-verdaute pUC8-DNA umkloniert. Dieses war möglich, da sowohl BclI und BamHI, als auch PvuII und SmaI gleichartige DNA-Enden produzieren, die direkt miteinander ligiert werden können. Das entstehende Plasmid wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI linearisiert und anschließend mit der Exonuklease Bal31 behandelt. Durch eine kontrollierte Reaktion konnten stufenweise etwa 300-350 bp von beiden Enden der DNA entfernt werden, wobei mit zunehmender Reaktionszeit die einzelnen DNA-Moleküle immer unterschiedlichere Längen aufwiesen. Der fortschreitende DNA-Abbau wurde durch Nachverdauen eines Teils der DNA mit dem Restriktionsenzym SmaI (siehe Abb. 9), gelelektrophoretischer Auftrennung und Größenvergleich der entstehenden Fragmente mit der als Längenstandard benutzten PstI-geschnittenen Lambda-DNA verfolgt (siehe Abb. 11). Für die weitere Arbeit wurde das DNA-Aliquot benutzt, bei dem von beiden Enden ca. 120-140 bp abgedaut waren. Dieses Aliquot konnte leicht identifiziert werden, da der Längenstandard ein Fragment von 514 bp aufweist und die gesuchten DNA-Moleküle ebenfalls SmaI-Fragmente in dieser Größe zeigen sollten (siehe Abb. 11).

Die Bal31-behandelte, lineare DNA wurde in Anwesenheit eines etwa 70-fachen molaren Überschusses eines zuvor am 5'-Ende phosphorylierten BglII-Linkers recircularisiert. Linkermultimere wurden aus den Plasmidmolekülen durch erneute Verdauung mit dem Restriktionsenzym BglII und Religation entfernt. Ein Teil dieser DNA wurde in BMH71-18 transformiert. Von den resultierenden Transformanten wurden einige ausgewählt, die Plasmide mit einer neugeschaffenen PstI-Schnittstelle aufwiesen (siehe 3.2.1.2, Punkt 3). Mit Hilfe einer zweiten PstI-Schnittstelle, die sich wenige Nukleotide von der oben erwähnten BclI-Schnittstelle entfernt befindet,

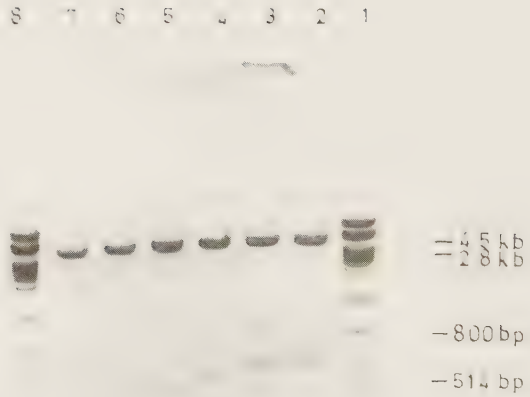


Abb. 11: Fortschreitende Bal31-Verdauung von T-DNA-Gen 6b enthaltender pUCS-DNA. Die DNA wurde nach Stoppen der Reaktion mit dem Restriktionsenzym SmaI verdaut, wodurch die kontinuierliche Verkürzung des anfänglich 650 bp großen Fragments gut sichtbar wird. In Spur 2 ist DNA vor Beginn der Bal31-Behandlung aufgetragen. Die Spuren 3-7 zeigen Aliquots, die nach 1.5 Min in Abständen von 75 Sek entnommen wurden. Die immer schwächer werdende DNA-Bande ist auf den zunehmenden Längenpolymorphismus zurückzuführen. In Spuren 1 und 8 ist PstI-geschnittene Lambda-DNA zum Größenvergleich aufgetragen.

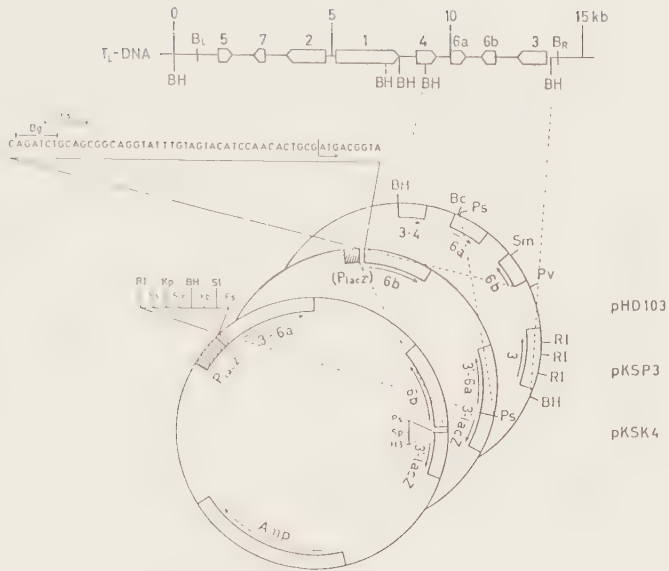
konnte von diesen Plasmiden je ein 1.7 kb großes PstI-Fragment mit der kodierenden Region von Gen 6b in M13mp9 umklontiert werden. Durch Verdauung mit dem Restriktionsenzym BglII wurden anschließend Kandidaten ausgewählt, bei denen die neugeschaffene PstI-Schnittstelle des einklonierten Fragments auf das in 3.2.1.2, Punkt 3 beschriebene Ereignis, also die Ligierung des Linkers an eine endständige "CAG"-Sequenz der Bal31-verdauten DNA, zurückzuführen war (Anm.: Eine PstI-Schnittstelle kann auch durch das Ligieren zweier Linkermoleküle entstehen; hierbei wird aber beim Umklonieren des PstI-Fragments die BglII-Schnittstelle in der resultierenden DNA erhalten). Die weiteren Experimente wurden mit zwei dieser M13-Kandidaten fortgesetzt, bei denen das einklonierte PstI-Fragment von demselben Ausgangsplasmid abstammte und die dieses Fragment in beiden möglichen Orientierungen enthielten. Das Ausgangsplasmid erhielt den Namen pKSP3 (siehe Abb. 13), die M13-Kandidaten wurden M13KSK1 und M13KSK2 genannt.

Um die genaue Position der neugeschaffenen PstI-Schnittstelle zu identifizieren, wurde die DNA-Sequenz von M13KSK1 in dem interessierenden Bereich bestimmt (siehe Abb. 12). Hierbei zeigte sich, daß das aufgrund der eingesetzten Klonierungsstrategie erwartete Ergebnis erhalten werden konnte. Die der kodierenden Region von T-DNA-Gen 6b vorausgehende DNA-Sequenz wurde bis auf 35 bp entfernt. Somit ist der Promotor vollständig abgedaut worden, ohne daß die kodierende Region verändert wurde.

Das PstI-Fragment von M13KSK2 mit der kodierenden Region von T-DNA-Gen 6b wurde in einem weiteren Schritt in pUC18 umklontiert. Zwei daraus resultierende Plasmide mit dem Fragment in beiden möglichen Orientierungen wurden pKSK3 und pKSK4 genannt und sind mit ca. 4.4 kb etwa halb so groß wie die M13-Konstrukte (9.25 kb). Abbildung 13 zeigt zusammenfassend die bisher beschriebenen Klonierungsschritte.



Abb. 12: DNA-Sequenz des Übergangs von Vektor- in T-DNA bei M13KSK1. Die neugeschaffene PstI-Schnittstelle und der Beginn der kodierenden Region von Gen 6b sind bezeichnet (vgl. Sequenz mit Abb. 10). Die Leserichtung ist in beiden Spalten von unten nach oben



- ① T₄:BamHI → pUR2-Bam:BamHI
- ② pHD103:BclI · PvuII → pUC8:BamHI·SmaI
(EcoRI Bcl3I BglII-linker Ligase)
- ③ pKSP3:PstI → pUC18:PstI

Abb. 13: Klonierungsschritte für die Herstellung einer promotorlosen Gen 6b-Konstruktion. Der Promotor des Gens wurde mit der Exonuklease Bcl3I abgedaut und die Gen 6b-kodierende Region in M13- und pUC-Vektoren umklont. Die hervorgehobene DNA-Sequenz stellt den Rest der 5'-untranslatierten Region vor dem Startcodon von Gen 6b dar (Restriktionsschnittstellen: RI = EcoRI, Ss = SstI, Kp = KpnI, Sm = SmaI, BH = BamHI, Xb = XbaI, S1 = SalI, Ps = PstI, Sp = SphI, H3 = HindIII, Bg = BglIII, Bc = BclII, Pv = PvuII)

3.2.1.4 Gen 6b unter der Kontrolle des T_R-Promotors

Für die Klonierung der Gen 6b-kodierenden Region hinter den 1'-Promotor der T_R-DNA wurde ein 1.7 kb großes HindIII/SalI-Fragment aus M13KSK1 (vgl. Fragment aus pKSK4, Abb. 13) in das Plasmid pAS2022 (Tab. 2) eingesetzt. Dadurch wurde das Startcodon von Gen 6b in einen Abstand von 138 bp hinter die Hognessbox des Promotors gebracht. In der T_R-DNA ist das Startcodon des Gens 1' 90 bp von diesem Promotorelement entfernt (Velten et al. 1984). Transformanten wurden durch Verdauen von Plasmid-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen analysiert. Das Plasmid eines Kandidaten, das alle erforderlichen Bedingungen bei dieser Analyse erfüllte, wurde pSTR1 genannt (siehe Abb. 15).

3.2.2 Subklonieren eines Fragments mit Gen 6b unter Kontrolle des T-DNA-eigenen Promotors

Um zu Vergleichszwecken Gen 6b unter der Kontrolle seines T-DNA-eigenen Promotors einsetzen zu können, mußte es von den flankierenden Genen 3 und 6a isoliert werden (vgl. Abb. 9). Zu diesem Zweck wurde ein 2.7 kb großes PstI/EcoRI-Fragment von pH103 in SmaI/EcoRI-geschnittene pUC18-DNA umklont. Da PstI und SmaI DNA verschiedenartig schneiden, mußten für die Ligation 3'-überhängende DNA-Enden nach der PstI-Verdauung mit T4-DNA-Polymerase abgedaut werden. Transformanten, die das gewünschte Plasmid enthielten, wurden durch Analyse mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII ausgewählt. Mit dem Plasmid eines Kandidaten, das den Namen pORG6 erhielt (siehe Abb. 15), wurde die Arbeit fortgesetzt.

3.2.3 Überführen der Gene 6b und 4 in die T-DNA

Um bei der Analyse der Funktion des in vitro manipulierten Gens 6b Störungen durch nichtrelevante DNA-Sequenzen auszuschließen, mußte das Gen für den Transfer in Pflanzen in eine T-DNA eingebaut werden, welche über möglichst wenig zusätzliche DNA verfügt. In den weiteren Versuchen wurde daher ein binäres T-DNA-Vektor-System eingesetzt, dessen Grundlage die pBR322-Abkömmlinge pGV943 und pGV941 waren (unterschieden durch das Gen nptII der Neomycinphosphotransferase für Kanamycinresistenz; siehe Tab. 2). Beide Plasmide enthalten eine verkürzte T-DNA (durch Einklonieren von Fragmenten, die lediglich die beiden Bordersequenzen der T-DNA aufweisen) und sind durch den zusätzlichen Replikationsorigin des Pseudomonas-Plasmids pVS1 in E. coli und Agrobacterium eigenständig replizierfähig. Da für Klonierungsarbeiten weitere Restriktionsschnittstellen benötigt wurden, und um rekombinante Plasmide aufgrund der Alpha-Komplementation der Beta-Galaktosidase leichter auswählen zu können (siehe 2.4.6), mußten beide Vektoren weiterentwickelt werden.

3.2.3.1 Weiterentwicklung von binären T-DNA-Vektoren

Zwei außerhalb der T-DNA liegende, jeweils in Einzahl vorhandene EcoRI- und HindIII-Schnittstellen beider Plasmide wurden in unabhängigen Schritten durch Linearisierung mit dem jeweiligen Enzym, Auffüllen der Enden mit DNA-Polymerase und Religation entfernt. Danach wurde das 439 bp große lacZ_{alpha}-Fragment von pUC19 (siehe 2.4.1) in die mit DNA-Polymerase aufgefüllte BamHI-Schnittstelle beider Plasmide kloniert. Mehrere auf IPTG/X-Gal-Indikatorplatten blau gefärbte BMH71-18-Transformanten wurden isoliert und ihre Plasmide mit verschiedenen Restriktionsenzymen analysiert. Je ein Abkömmling von pGV943 und pGV941 mit dem lacZ_{alpha}-Fragment in der T-DNA wurde für die weitere Arbeit ausgewählt und pSRB3 bzw. pSRB4 genannt. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der Restriktionsverdauungen. Es ist zu erkennen, daß von den verschiedenen Restriktionsschnitt-

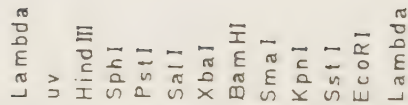


Abb. 14: Restriktionsanalyse der binären T-DNA-Vektoren pSRB3 (oben) und pSRB4. Die Plasmide wurden mit den bezeichneten Restriktionsenzymen verdaut und die Fragmente auf 1 %-igen Agarosegelen aufgetrennt. PstI-geschnittene lambda-DNA diente als Längenmarker (uv = unverdaute Plasmid-DNA)

stellen des pUC19-Polylinkers die EcoRI-, SmaI-, XbaI-, SalI- und HindIII-Schnittstellen jeweils nur einmal vorhanden sind. Die Orientierung des lacZ_{alpha}-Fragments ließ sich erst nach Klonieren einer längeren DNA-Sequenz in den Polylinker feststellen. Dabei zeigte sich, daß bei pSRB4 das Alpha-Fragment des lacZ-Gens in die gleiche Richtung transkribiert wird wie das Ampicillinresistenzgen des Vektors, während bei pSRB3 beide Gene gegenläufig abgelesen werden. Bei den beschriebenen Klonierungsarbeiten war die Transformationsrate beider Vektoren mit $5-6 \times 10^4$ Kolonien pro µg eingesetzter DNA um den Faktor 10 bis 20 geringer als bei parallel zur Kontrolle verwendeten pUC-Plasmiden.

3.2.3.2 Klonieren von T-DNA-Genen in pSRB3 und pSRB4

Für die Klonierung von T-DNA-Gen 4 wurde das Plasmid pGV0507 (Tab. 2) mit den Restriktionsenzymen BglII und PvuII verdaut und das 2.2 kb große, Gen 4 enthaltende DNA-Fragment aus einem Agarosegel isoliert (vgl. Abb. 9). Das Fragment wurde in die Plasmide pKSK4 (promotorloses Gen 6b; siehe 3.2.1.3 und Abb. 13), pORG6 (Gen 6b unter Kontrolle des T-DNA-eigenen Promotors; siehe 3.2.2), pSRB3 und pSRB4 (binäre T-DNA-Vektoren; siehe 3.2.3.1) kloniert. Daraus entstehende Plasmide wurden pKSK44, pORG46, pBVG4 und pBVG4neo genannt. Anschließend wurden aus pKSK4, pKSK44, pORG6, pORG46 und pSTR1 (Gen 6b unter Kontrolle des 1'-Promotors der T_R-DNA; siehe 3.2.1.4) DNA-Fragmente, die Gen 6b oder Gen 6b und Gen 4 enthielten, in pSRB3, pBVG4 (jeweils ein 4 kb großes EcoRI/ApaI-Fragment aus pSTR1) bzw. pSRB4 umkloniert. Auf diese Weise wurde eine Serie von Plasmiden konstruiert, die in der T-DNA alle möglichen Kombinationen der Gen 6b-Konstrukte mit Gen 4, sowie diese Gene allein enthielten. Darüberhinaus war auch das Gen nptII (unter Kontrolle des 2'-Promotors der T_R-DNA oder des Nos-Promotors) als Selektionsmarker in allen Fällen in die T-DNA integriert. Die Konstrukte und die Klonierungsschritte für deren Entstehung sind in Abb. 15 dargestellt. Aus der Abbildung geht auch der funktionelle Aufbau der pSRB-Plasmide hervor.

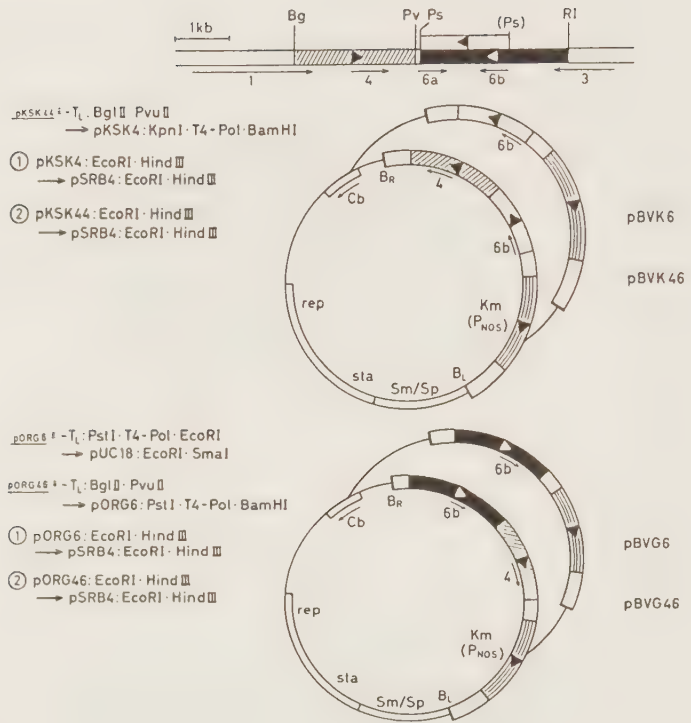


Abb. 15: Plasmide mit verschiedenen Fragmenten der T-DNA eines Ti-Plasmids vom Octopintyp. Fragmente^L der T-DNA, durch verschiedene Schraffuren hervorgehoben, wurden entsprechend den Konstruktionsbeschreibungen neben den Plasmiden in binäre T-DNA-Vektoren kloniert. Die Konstruktion der Vorläuferplasmide pKSK44, pORG6 und pORG46 ist ebenfalls angegeben (Cb, Sm, Sp, Km = Resistenzgene; rep, sta = Replikationsorigin und Region für Plasmidstabilität aus pVS1; B_L, B_R = linke und rechte T-DNA-Border; Bg, Pv, Ps, RI = Restriktionsschnittstellen, vgl. Abb. 13)

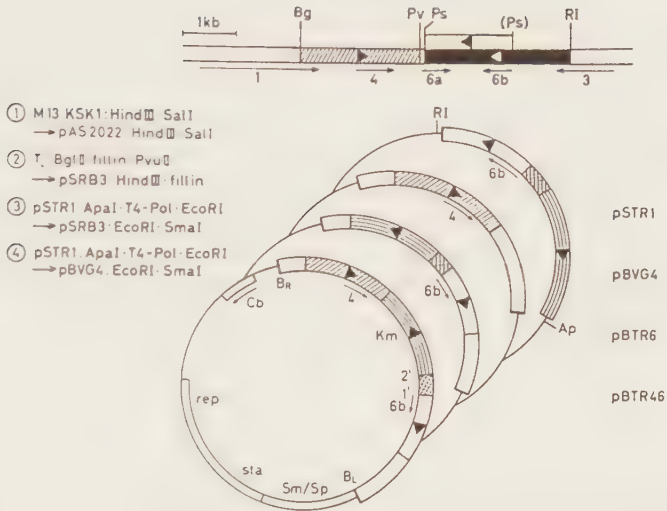


Abb. 15: Fortsetzung (Ap = Schnittstelle für das Restriktionsenzym Apal)

3.2.4 Transfer von E. coli-Plasmiden nach Agrobacterium

Die in 3.2.3.2 beschriebenen T-DNA-Konstrukte wurden mit Hilfe des E. coli-Helferstamms GJ23 (siehe Tab. 2) nach Agrobacterium überführt. Dieser Helferstamm stellt für den konjugativen Transfer von Plasmid-DNA zwischen Bakterien die Transfer- und Mobilisierungsfunktionen zur Verfügung, welche auf den für die Klonierungsarbeiten benutzten E. coli-Plasmiden nicht vorhanden sind. Als Akzeptor diente ein Agrobacterium-Stamm, der das T-DNA-freie Ti-Plasmid pGV2260 vom Octopintyp enthielt (siehe Tab. 2). Dieses Plasmid stellt die Gene der Virulenzregion für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle bereit. Um die phänotypische Ausprägung von Gen 6b in Zusammenwirken mit Gen tzs eines Ti-Plasmids vom Nopalintyp (siehe Abb. 3) analysieren zu

können, wurde das Plasmid pSTR1 (Gen 6b unter Kontrolle des 1'-Promotors der T_R-DNA; siehe 3.2.1.4 und Abb. 15) in einen Agrobacterium-Stamm transferiert, der den Vektor pGV3850 enthielt (siehe Tab. 2). Transkonjuganten wurden aufgrund ihrer Fähigkeit, auf Agarmedien mit entsprechenden Antibiotika bzw. Octopin oder Nopalin als einziger Stickstoff- und Kohlenstoffquelle zu wachsen, für die weitere Arbeit selektiert. Die Konjugationsrate war in allen Fällen 10^{-5} - 10^{-6} . In Tab. 4 sind die im Verlaufe der vorliegenden Arbeit isolierten Agrobacterium-Stämme zusammengefaßt.

Tab. 4: Agrobacterium-Stämme für die funktionelle Charakterisierung von T-DNA-Gen 6b. Die in Abb. 15 dargestellten Plasmide wurden durch konjugativen Transfer in Agrobacterium-Stämme überführt, die die Ti-Plasmide pGV2260 vom Octopintyp oder pGV3850 vom Nopalintyp enthielten

<u>Agrobacterium</u> -Stamm	Beschreibung
C58C1(pGV2260,pBTR6)	Gen <u>6b</u> mit 1'-Promotor
C58C1(pGV2260,pBTR46)	Gen <u>6b</u> mit 1'-Promotor, dazu Gen <u>4</u>
C58C1(pGV2260,pBVG6)	Gen <u>6b</u> mit eigenem Promotor
C58C1(pGV2260,pBVG46)	Gen <u>6b</u> mit eigenem Promotor, dazu Gen <u>4</u>
C58C1(pGV2260,pBVK6)	Gen <u>6b</u> ohne Promotor
C58C1(pGV2260,pBVK46)	Gen <u>6b</u> ohne Promotor, dazu Gen <u>4</u>
C58C1(pGV3850::pSTR1)	Gen <u>6b</u> mit 1'-Promotor, dazu Gen <u>tzs</u>
C58C1(pGV2260,pBVG4)	Gen <u>4</u> allein
C58C1(pGV2260,pBVG4neo)	Gen <u>4</u> allein mit Kanamycinresistenzgen

3.3 Analyse der physiologischen Wirkung von T-DNA-Gen 6b

3.3.1 In vitro-Infektion von Blattscheibchen

Für die Analyse der physiologischen Wirkung von T-DNA-Gen 6b wurden Blattstückchen von Nicotiana tabacum var. Petit Havana "SR1" auf Wachstumsmedien mit unterschiedlichen Cytokininkonzentrationen mit den in Tab. 4 beschriebenen Agrobacterium-Stämmen inokuliert. Parallel wurden der Ti-Plasmid-freie Stamm C58C1 und die für den konjugativen Transfer benutzten Akzeptorstämme C58C1(pGV2260) und C58C1(pGV3850) eingesetzt. Alle Versuchsansätze sind in Tab. 5 aufgelistet.

In Vorversuchen wurde zunächst der Einfluß des synthetischen Cytokinins 6-Benzylaminopurin (BAP) auf die Entwicklung von Blattstückchen untersucht. Hierbei konnte eine Konzentration von 0.5 mg/l BAP als diejenige ermittelt werden, bei der sich der stärkste phänotypische Effekt ergab. Wie Tab. 5 zu entnehmen ist, wurden daher alle Bakterien auf hormonfreiem und auf Medium mit 0.5 mg/l BAP eingesetzt. Darüberhinaus wurden Blattstückchen mit ausgesuchten Bakterienstämmen auf Medien mit weiteren, in Tab. 5 bezeichneten BAP-Konzentrationen inokuliert (Nr. 1, 4, 5, 16, 19 und 21 in Tab. 5). Die Experimente wurden mindestens zweimal mit je 16 Blattstückchen für jede Behandlung und BAP-Konzentration durchgeführt und die Entwicklung der Blattscheiben über einen Zeitraum von 8-9 Wochen beobachtet.

Unbehandelte Blattstückchen (Nr. 1 in Tab. 5), die in allen Experimenten als Kontrolle und Referenz eingesetzt wurden, zeigten bei BAP-Konzentrationen von 0.1, 0.5 und 1 mg/l eine intensive Sproßbildung (Anm.: da sich sehr viele Sprosse auf engem Raum bildeten, war eine exakte Quantifizierung durch Auszählen nicht möglich; um andererseits eine Störung der weiteren Entwicklung durch Abschneiden zu verhindern, mußte die Sproßbildung nach dem Gesamteindruck einer großen Anzahl Blattstückchen beurteilt werden). Die ersten Sprosse waren 18 Tage nach Beginn des Experiments auf Medium mit 0.5 mg/l

Tab. 5: Behandlungen von Blattstückchen von *Nicotiana tabacum* für die Analyse von T-DNA-Gen 6b. Blattstückchen wurden auf MS₀-Medien, die das synthetische Cytokinin 6-Benzylaminopurin (BAP) in verschiedenen Konzentrationen (Angaben in mg/l) enthielten, mit den bezeichneten *Agrobacterium*-Stämmen inokuliert (+ = Behandlung durchgeführt; - = Behandlung nicht durchgeführt; / = Koinokulation mit zwei verschiedenen *Agrobacterium*-Stämmen)

Nr. Behandlung		BAP-Konzentration des Kulturmediums					
		0	0.1	0.5	1	2	5
1	unbehandelt	+	+	+	+	+	+
2	C58C1	+	-	+	-	-	-
3	C58C1(pGV2260)	+	-	+	-	-	-
4	C58C1(pGV3850)	+	+	+	+	+	+
5	C58C1(pGV2260, pBVG4)	+	+	+	+	+	+
6	C58C1(pGV2260, pBVG4neo)	+	-	+	-	-	-
7	C58C1(pGV3850) / C58C1(pGV2260, pBVG4)	+	-	+	-	-	-
8	C58C1(pGV2260, pBVK6)	+	-	+	-	-	-
9	C58C1(pGV2260, pBVK6) / C58C1(pGV2260, pBVG4)	+	-	+	-	-	-
10	C58C1(pGV2260, pBVK6) / C58C1(pGV3850)	+	-	+	-	-	-
11	C58C1(pGV2260, pBVK46)	+	-	+	-	-	-

Tab. 5: Fortsetzung

Nr.	Behandlung	BAP-Konzentration des Kulturmediums					
		0	0.1	0.5	1	2	5
12	C58C1(pGV2260,pBVG6)	+	-	+	-	-	-
13	C58C1(pGV2260,pBVG6)	+	-	+	-	-	-
14	C58C1(pGV2260,pBVG6)	+	-	+	-	-	-
15	C58C1(pGV2260,pBVG46)	+	-	+	-	-	-
16	C58C1(pGV2260,pBTR6)	+	+	+	+	+	+
17	C58C1(pGV2260,pBTR6)	+	-	+	-	-	-
18	C58C1(pGV2260,pBTR6)	+	-	+	-	-	-
19	C58C1(pGV2260,pBTR46)	+	+	+	+	+	+
20	C58C1(pGV2260,pBTR46)	+	-	+	-	-	-
21	C58C1(pGV3850::pSTR1)	+	+	+	+	+	+
22	C58C1(pGV3850::pSTR1)	+	-	+	-	-	-

BAP zu beobachten. Bei 0.1 und 1 mg/l BAP traten Sprosse nach 22 bzw. 24 Tagen erstmals auf. Etwa 30-40 Tage nach Beginn des Experiments war die Sproßbildung bei den drei BAP-Konzentrationen so intensiv, daß kein Unterschied mehr festgestellt werden konnte. Auf Medium mit 2 mg/l BAP traten an den Blatträndern viele kompakt organisierte Sproßansätze auf, die sich nur noch in Einzelfällen nach langer Zeit (40-50 Tagen) zu normalen Sprossen weiterentwickelten. Diese Sproßansätze waren vereinzelt auch auf Medium mit 5 mg/l BAP zu beobachten, doch kam es hier in keinem Fall zu einer Weiterentwicklung. Darüberhinaus zeigten die Blattstückchen auf diesem Medium keine weitere Veränderung. Wurde dem Medium kein BAP zugesetzt, starben die Explantate nach 3-4 Wochen ab.

Die beschriebene Entwicklung der Blattstückchen wurde durch Inokulation mit Agrobacterium-Stämmen, die kein Ti-Plasmid oder das T-DNA-freie Plasmid pGV2260 vom Octopintyp enthielten (Helferplasmid für das binäre T-DNA-Vektorsystem, siehe 3.2.4; Nr. 2 und 3 in Tab. 5), bei keiner BAP-Konzentration beeinflußt. Dagegen war auf hormonfreiem Medium intensive Sproßbildung bei Inokulation mit einem Agrobacterium-Stamm zu beobachten, der das Nopalin-Ti-Plasmid pGV3850 enthielt (Akzeptorplasmid für pSTR1 mit dem Cytokiningen tzs in der Vir-Region, siehe 3.2.4; Nr. 4 in Tab. 5). Hierbei traten die Sprosse bereits nach 10-12 Tagen auf. Bei Inokulation der Blattstückchen mit diesem Bakterienstamm auf BAP-haltigem Medium wurde die Sproßbildung mit zunehmender Cytokininkonzentration stark reduziert; auf Medium mit 1 mg/l BAP waren nur noch Sproßansätze zu beobachten. BAP-Konzentrationen von 2 und 5 mg/l führten weder zu Wachstum noch zur Differenzierung der Explantate.

Wurden Blattstückchen mit Agrobacterium-Stämmen inokuliert, die nur T-DNA-Gen 4 enthielten (Nr. 5 und 6 in Tab. 5), setzte im Unterschied zu unbehandelten Blattstückchen auch auf hormonfreiem Medium nach etwa 32 Tagen eine intensive Sproßproduktion ein. Auf BAP-haltigem Medium wurde die Sproßbildung im Vergleich zu unbehandelten Explantaten

leicht reduziert. Sproßansätze, die sich nicht weiterentwickelten, waren bereits bei 0.5 mg/l BAP zu beobachten. Bei BAP-Konzentrationen von 2 und 5 mg/l war die Entwicklung der Explantate im Vergleich zu unbehandelten Blattstückchen verlangsamt. Die gleichzeitige Inokulation mit Bakterienstämmen, welche das Nopal-Ti-Plasmid pGV3850 (Gen tzs) bzw. T-DNA-Gen 4 enthielten (Koinokulation; Nr. 7 in Tab. 5), führte nur auf BAP-haltigen Medien zu einer geringen Reduktion der Sproßbildung im Vergleich zu C58C1(pGV3850)-inokulierten Blattstückchen, während auf BAP-freiem Medium kein Unterschied festzustellen war.

Im Gegensatz zur Induktion durch BAP oder T-DNA-Gen 4 war die beschriebene Sproßproduktion beim Nopal-Ti-Plasmid pGV3850 nicht anhaltend. Dieses konnte in Kontrollexperimenten durch Entfernen der ersten Sprosse von einigen Blattstückchen gezeigt werden. Abbildung 16 stellt schematisch den Zusammenhang zwischen den verschiedenen Versuchsbedingungen (BAP, pGV3850 mit Gen tzs bzw. T-DNA-Gen 4) und der Sproßbildung der Explantate dar.

Wurden Blattstückchen unter verschiedenen Bedingungen mit Agrobacterium-Stämmen inokuliert, welche T-DNA-Gen 6b ohne Promotor enthielten (Nr. 8-11 in Tab. 5), traten keine phänotypischen Unterschiede zu Explantaten auf, die nur mit BAP und/oder Bakterien, welche pGV3850 oder T-DNA-Gen 4 enthielten, behandelt waren (vgl. Beschreibungen für Nr. 3-6 aus Tab. 5). Ebenso konnte auf hormonfreiem Medium bei Inokulation von Blattstückchen mit Agrobacterium-Stämmen, die ausschließlich Gen 6b unter Kontrolle des T-DNA-eigenen (Nr. 12 in Tab. 5) oder des 1'-Promotors der T_R-DNA (Nr. 16 in Tab. 5) enthielten, kein phänotypischer Unterschied zu unbehandelten Explantaten festgestellt werden: in allen Fällen starben sie innerhalb von 3-4 Wochen ab.

Dagegen waren unter allen anderen Bedingungen Unterschiede zu den bereits beschriebenen Phänotypen der verschiedenen Kontrollen zu beobachten, wenn die Explantate mit Agrobacterium-Stämmen inokuliert wurden, die Gen 6b unter

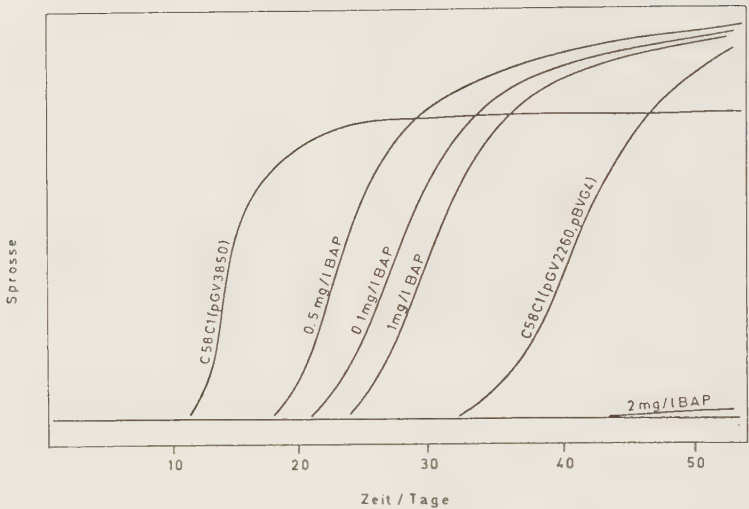


Abb. 16: Induktion von Sprossen bei Blattstückchen von *Nicotiana tabacum* unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Explantate wurden mit einem *Agrobacterium*-Stamm, der das Nopalini-Ti-Plasmid pGV3850 (Gen *tzs*) enthielt, mit BAP in verschiedenen Konzentrationen im Wachstumsmedium oder mit einem *Agrobacterium*-Stamm, der T-DNA-Gen 4 enthielt, behandelt. Sproßproduktion trat zu verschiedenen Zeitpunkten auf. Im Fall von pGV3850 war die Fähigkeit zur Sproßbildung zeitlich begrenzt. Bei 2 mg/l BAP traten nur sporadisch Sprosse nach langer Zeit auf

Kontrolle des T-DNA-eigenen (Nr. 12-15 in Tab. 5) oder des 1'-Promotors (Nr. 16-22 in Tab. 5) enthielten. Diese Unterschiede traten vornehmlich in der Intensität der Sproßbildung auf, während die Entwicklungsgeschwindigkeit der Explantate durch Anwesenheit von Gen *6b* nur unwesentlich beeinflusst wurde. Darüberhinaus war der Einfluß von Gen *6b* unter Kontrolle des T-DNA-eigenen Promotors weniger stark ausgeprägt als beim 1'-Promotor der T_R-DNA.

Wie Abb. 17 und 18 zeigen, war die Art des Einflusses von Gen 6b auf die Sproßproduktion von den jeweiligen Versuchsbedingungen abhängig. In den Abbildungen sind phänotypische Unterschiede, die bei sonst gleicher Behandlung der Explantate durch die Anwesenheit von T-DNA-Gen 6b (hier zur Verdeutlichung ausschließlich unter Kontrolle des 1'-Promotors) hervorgerufen wurden, an Hand von fünf repräsentativen Beispielen dargestellt. Es ist zu sehen, daß in Anwesenheit von Gen 6b die Sproßproduktion stark reduziert wurde, wenn diese durch die alleinige Wirkung von 0.5 mg/l BAP (Abb. 17a; Vergleich Nr. 1 und 16 in Tab. 5) oder des Ti-Plasmids pGV3850 (Gen tzs; Abb. 17b; Vergleich Nr. 4 und 21 in Tab. 5) oder des T-DNA-Gens 4 (Abb. 17c; Vergleich Nr. 5 und 19 in Tab. 5) induziert war. Auf der anderen Seite wurde die Sproßproduktion in Anwesenheit von Gen 6b stimuliert, wenn durch eine BAP-Konzentration von 2 mg/l (Abb. 18a; Vergleich Nr. 1 und 16 in Tab. 5) oder die gleichzeitige Wirkung von 0.5 mg/l BAP und Gen tzs des Nopalini-Ti-Plasmids pGV3850 (Abb. 18b und 18c; Vergleich Nr. 4 und 21 in Tab. 5) Sproßbildung in Abwesenheit des Gens 6b in nur sehr geringem Maße auftrat.

Weiterhin war für Gen 6b nicht die Notwendigkeit einer strikten Kopplung zum Nopalini-Ti-Plasmid pGV3850 oder T-DNA-Gen 4 im gleichen Bakterium festzustellen, um die beschriebenen phänotypischen Unterschiede zu bewirken. Auch wenn bei Koinokulationen Gen 6b und das Nopalini-Ti-Plasmid (bzw. T-DNA-Gen 4) in verschiedenen Agrobacterium-Stämmen eingesetzt wurden (Vergleich Nr. 18 und 21 bzw. Nr. 17 und 19 in Tab. 5), traten dieselben phänotypischen Unterschiede zu den entsprechenden Kontrollansätzen auf, bei denen das Gen nicht anwesend war. Die Ergebnisse aller Experimente sind in Tab. 6 zusammenfassend dargestellt.



400 . Inhibition der Sproßbildung bei Blattstückchen von *Nicotiana tabacum* durch die Wirkung von T-DNA-Gen 6b. Sproßproduktion wurde unter verschiedenen Bedingungen in Ab- (jeweils linkes Explantat) und Anwesenheit (rechts) des Gens unter Kontrolle des 1'-Promotors der T_P-DNA untersucht. Die Zeit nach Beginn des Experiments ist für jedes Beispiel in Klammern angegeben. Die ebenfalls in Klammern angegebenen Nummern beziehen sich auf Tab. 5

- a. Explantate auf Medium mit 0.5 mg/l BAP (Nr. 1 und 16; Tag 29)
- b. Explantate auf hormonfreiem Medium, transformiert mit T-DNA-Gen 4 (Nr. 5 und 19; Tag 51)
- c. Explantate auf hormonfreiem Medium, inokuliert mit Bakterien, die das Nopal-Ti-Plasmid pGV3850 mit Gen tzs enthielten (Nr. 4 und 21; Tag 19)



Abb. 18: Stimulation der Sproßbildung bei Blattstückchen von *Nicotiana tabacum* durch die Wirkung von T-DNA-Gen 6b. Sproßproduktion wurde unter verschiedenen Bedingungen in Ab- (bei a linkes Explantat) und Anwesenheit (bei a rechtes Explantat) des Gens unter Kontrolle des 1'-Promotors der T₀-DNA untersucht. Die Zeit nach Beginn des Experiments ist für jedes Beispiel in Klammern angegeben. Die ebenfalls in Klammern angegebenen Nummern beziehen sich auf Tab. 5

- a. Explantate auf Medium mit 2 mg/l BAP (Nr. 1 und 16; Tag 45)
- b. Explantat auf Medium mit 0.5 mg/l BAP, inokuliert mit Bakterien, die das Nopalini-Ti-Plasmid pGV3850 mit Gen tzs enthielten (Nr. 4; Tag 19)
- c. Wie 18b, jedoch inokuliert mit Bakterien, die Gen 6b im Ti-Plasmid pGV3850 enthielten (Nr. 21; Tag 19)

Tab. 6: Einfluß von I-DNA-Gen 6b unter Kontrolle des 1'-promotors der I_R-DNA auf die Sproßproduktion bei Blattstückchen von *Nicotiana tabacum*. Sprosse wurden durch Inokulation mit einem *Agrobacterium*-Stamm, der das I₁-Plasmid pGV3850 mit Gen *tzs* enthielt, durch BAP im Wachstumsmedium, durch Transformation mit I-DNA-Gen 4 oder durch die gleichzeitige Wirkung von BAP und Gen *tzs* bzw. Gen 4 induziert. Die Anzahl der Sprosse variierte stark (+++ = sehr viele Sprosse, + = wenige Sprosse, (+) = einzelne Sprosse nach langer Zeit); erste Anzeichen der Sproßbildung waren nach den angegebenen Zeiten zu beobachten. Weitere Organogenese trat bzw. trat nicht nach Entfernen der ersten Sprosse fortgesetzt auf. Bei Einsatz von Gen 6b unter Kontrolle des I-DNA-eigenen Promotors waren nicht so starke Unterschiede in der Sproßbildung zu beobachten

	pGV3850 Gen <i>tzs</i>	BAP in mg/l		Gen 4	0.5 mg/l BAP	
		0.5	1/0.1		+Gen <i>tzs</i>	+Gen 4
ohne Gen 6b	Anzahl Sprosse	+++	+++	(+)	+	++
	nach Tagen	10-12	21-24	44-50	10-12	19-20
	fortgesetzt	nein	ja	ja	ja	ja
mit Gen 6b	Anzahl Sprosse	++	+	+	++	+++
	nach Tagen	11-13	23-26	42-50	10-11	18-20
	fortgesetzt	nein	ja	ja	ja	ja

3.3.2 Regeneration transgener Pflanzen mit Gen 6b unter Kontrolle des 1'-Promotors der T_R-DNA

Blattscheibchen, die auf hormonfreiem Medium mit dem Bakterienstamm C58C1(pGV3850::pSTR1) transformiert waren (Nr. 21 in Tab. 5; Gen 6b unter Kontrolle des 1'-Promotors), wurden 14 Tage nach der Inokulation auf dem gleichen, jedoch das Antibiotikum Kanamycin (100 mg/l) enthaltende Medium subkultiviert. Aufgrund dieser Selektion konnten bei 24 Explantaten nach 3 Wochen nur 37 grüne, wachsende, neben einer großen Anzahl weißer, absterbender Sprosse beobachtet werden. Die wachsenden Sprosse wurden von den Blattscheibchen abgeschnitten und erneut auf kanamycinhaltigem Medium subkultiviert. Nach 4 Wochen wurden die Sprosse auf Nopalinsynthase- und Neomycinphosphotransferaseaktivität getestet. Von den 37 Sprossen zeigten drei eine entsprechende Enzymaktivität in beiden Tests. Mit diesen transformierten Sprossen konnten jedoch bisher keine weiteren Experimente durchgeführt werden, da sie mit einer Größe von 3-5 cm zu klein waren.

3.3.3 Erste Charakterisierung einer Gen 6b-spezifischen Substanz

Um den möglichen Einfluß von T-DNA-Gen 6b auf den Cytokininstoffwechsel weiter zu analysieren, wurde in Zusammenarbeit mit Prof. K. Kleczkowski, Warschau, die Verteilung von Cytokininderivaten in den transformierten *in vitro*-Kulturen 1GV2215, 1GV2219 und 1GV2235 und in Blatt- und Wurzelmaterial von untransformiertem Tabak "SR1" untersucht. Die Zelllinie 1GV2235 verfügt hierbei nur über die T-DNA-Gene 3, 4 und 6a, während 1GV2215 und 1GV2219 auch Gen 6b enthalten (siehe Tab. 1). Methanolische Extrakte wurden wie in 2.3.2 beschrieben auf Kieselgeldünnschichtplatten chromatographiert und anschließend fraktionsweise mit beiden Cytokinin-Radioimmunoassays (ZR- und iPA_{Do}-Typ, siehe 2.3) analysiert. Bei diesen Untersuchungen wurde in Extrakten von 1GV2215 und 1GV2219 eine im UV-Licht hellblau

fluoreszierende Substanz (bei 366 nm starke, bei 254 nm schwache Fluoreszenz) mit Rf-Werten von 0.33 (in Laufmittel A, siehe 2.3.2) bzw. 0.49 (in Laufmittel B) beobachtet, die bei LGV2235 und untransformiertem Tabak bei gleicher Extraktmenge (bezogen auf das Frischgewicht) kaum sichtbar war. Diese Substanz cochromatographierte mit keinem der als Referenzen eingesetzten Cytokinin-derivate (Z, ZR, dHZ, dHZR, Z-9-G, ZOG, ZROG, dHZOG, dHZROG, iPAd, iPAo) und war weder mit dem ZR- noch mit dem iPAo-RIA meßbar. Durch das Enzym Beta-Glucosidase konnte die Substanz gespalten werden. Ein weiterhin fluoreszierendes (bei 254 nm jetzt starke Fluoreszenz), mit den Radioimmunoassays nicht meßbares Reaktionsprodukt zeigte Rf-Werte von 0.49 bzw. 0.84 in den benutzten Laufmitteln.

Für eine semiquantitative Analyse der Substanz wurde vergleichbares Blattmaterial von untransformierten Tabakpflanzen (Varietät Petit Havana "SR1" und Wisconsin 38), sowie der mit dem T-DNA-Gen 6b transformierten Pflanze rG6a/6b (Inze et al. 1984) wie in 2.8 beschrieben aufgearbeitet. Hierbei zeigte sich in mehreren unabhängigen Experimenten, daß die Substanz in Wildtyp-Tabak in geringen Mengen vorhanden ist, während sie in der Pflanze rG6a/6b eine um den Faktor 6-8 höhere Konzentration bezogen auf das Frischgewicht aufweist. In Abb. 19 sind die Elutionsprofile repräsentativer HPLC-Durchläufe für Extrakt von Tabak W38 und rG6a/6b dargestellt. Auch hier cochromatographiert die Substanz mit einer Retentionszeit von 25.9 Min mit keiner der eingesetzten Referenzen (Retentionszeiten: Z 25.0 Min, ZR 32.4 Min, iPAd 22.9 Min, iPAo 30.4 Min).

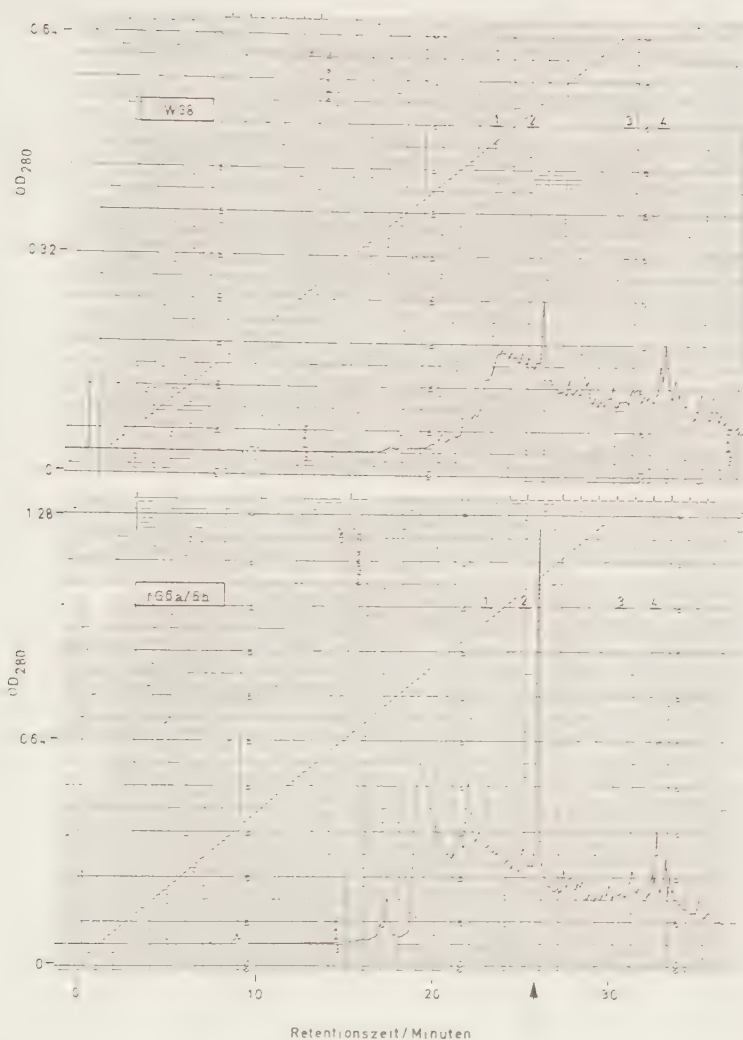


Abb. 19: HPLC-Elutionsprofile methanolischer Extrakte von *Nicotiana tabacum* W38 und der transgenen Pflanze rG6a/6b. Die optische Dichte (280 nm) der mit einem linearen Methanolgradienten eluierten Extrakte ist wiedergegeben (Auftragsmenge entspricht je 0.4 g Blatt; fluoreszierende Substanz mit Pfeil markiert; horizontale Balken geben die Retentionszeiten von Referenzen an: 1 = 1PAde, 2 = 2, 3 = 1PAde, 4 = 2P.

Methanolische Rohextrakte von 50 g Kallus der Zelllinie 1GV2219 (zunächst mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie vorgereinigt) und 10 g Blattmaterial der Pflanze rG6a/6b wurde wie in 2.8 beschrieben mit Hilfe der HPLC gereinigt und die fluoreszierende Substanz einer Strukturanalyse zugeführt. Erste, vorläufige massenspektroskopische und Kernspinresonanzanalysen zeigen eine Masse von 776 Dalton und deuten darauf hin, daß ein Disaccharid, bestehend aus einer Hexose und einer Pentose, an einen Cytokinin-grundkörper gebunden ist. Daneben ist ein weiterer Rest vorhanden, der bisher nicht identifiziert werden konnte.

4 DISKUSSION

Durch die Entdeckung des Ti-Plasmids in dem phytopathogenen Bakterium Agrobacterium tumefaciens konnte im Jahre 1974 ein entscheidender Fortschritt in dem Verständnis der molekularen Vorgänge bei der Entstehung einer weitverbreiteten Pflanzenkrankheit, den Wurzelhalsgallen oder Crown Gall Tumoren der Dikotyledonen, erzielt werden. Mit Hilfe molekulargenetischer Methoden wurde festgestellt, daß ein Teil bakteriellen Erbguts in die Pflanze transferiert wird und dort weitreichende physiologische und morphologische Änderungen hervorruft, die von der betroffenen Zelle nicht kontrolliert werden können. Die Information für diese Veränderungen ist dabei auf einem relativ kleinen DNA-Abschnitt von 12-15 kb, der sog. T-DNA, enthalten, der nur für wenige Gene kodiert. Daraus konnte geschlossen werden, daß die Genprodukte dieser Gene an entscheidenden Stellen in den Stoffwechsel der Pflanze eingreifen. Zunächst blieb aber noch unklar, wo diese Eingriffe stattfinden, welche Stoffwechselwege also beeinflußt werden. Es war allerdings schon seit längerer Zeit bekannt, daß transformierte Pflanzengewebe erhöhte Phytohormongehalte aufweisen und in vitro ohne die Zugabe dieser Wachstumsstoffe lebensfähig sind. Daher wurde eine Beteiligung der T-DNA-Gene am Phytohormonhaushalt vermutet, ohne daß dieses zunächst genauer spezifiziert werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche unternommen, die primäre Funktion der T-DNA-Gene und ihre physiologische Bedeutung für das Crown Gall-System zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden zwei Versuchsansätze durchgeführt. Einerseits wurden Phytohormongehalte in Tumorgeweben untersucht, welche durch Bakterienmutanten mit Defekten in den T-DNA-Genen 1, 2 und/oder 4 induziert worden waren. Solche Gewebe zeigen charakteristische Änderungen in der Tumormorphologie, welche die Vermutung nahelegen, daß diese drei Gene direkt oder indirekt in den Auxin- und Cytokininstoffwechsel der Pflanze eingreifen. Andererseits wurde ein weiteres T-DNA-Gen (6b),

isoliert von den übrigen Genen der T-Region, in ein Pflanzensystem eingebracht, um über die Beobachtung seiner physiologischen und morphologischen Wirkung auf die bisher unbekannte Funktion rückschließen zu können.

Phytohormonmessungen wurden bei in vitro- (siehe 3.1.1) und in vivo-Tumorgewebe von Nicotiana tabacum durchgeführt (siehe 3.1.2). Hierbei wurden vor allem solche Crown Gall-Gewebe untersucht, welche durch Defekte in den T-DNA-Genen 1 und/oder 2 Sproßbildung zeigten ("shooter"-Phänotyp; siehe Abb. 4 und 5). Gemäß den Ergebnissen von Skoog und Miller (1957) konnte vermutet werden, daß diese Sproßbildung durch einen erhöhten Cytokiningehalt gegenüber den unorganisiert wachsenden Wildtyptumoren ausgelöst wird. Diese Annahme konnte in allen untersuchten Fällen bestätigt werden. Wie Tab. 3 zeigt, sind bei den durch "shooter"-Mutanten von Agrobacterium transformierten in vitro-Zelllinien 1GV2100, 1GV2206 und 1GV2219 Cytokiningehalte meßbar, die um das mehrfache über denen des Wildtyptumorgewebes 1A6 liegen. Dieses trifft allerdings nur für Cytokinine vom Zeatinribosidtyp zu, während bei Cytokinininen vom Isopentenyladenosintyp diese Unterschiede nicht zu beobachten sind. Der erhöhte Cytokiningehalt der sproßbildenden Kulturen bleibt während des gesamten Kultivierungszeitraums erhalten. Alle vier transformierten Zelllinien, und ebenso die habituierte Linie NW, zeigen aber innerhalb kurzer Zeit nach der Subkultivierung (etwa 5-10 Tage) einen starken Anstieg, nach 10-15 Tagen jedoch wieder eine Reduktion des Cytokiningehalts. Dieses Verhalten der in vitro-Kulturen ist auch von Weiler (1981b) und Van Onckelen et al. (1984) beschrieben worden. Offensichtlich sind Anstieg und Reduktion des Cytokinin-gehalts mit der verstärkten Zellteilungsaktivität des Materials nach der Subkultivierung und dem anschließenden Übergang in die stationäre Wuchsphase zu erklären, obwohl nicht alle hier getesteten Kulturen eine gleich intensive Hormonschwankung aufweisen.

Auch bei den in vivo induzierten Primärtumoren ist ein höherer Cytokiningehalt in Geweben mit inaktiven Genen 1 und/oder 2 (Inokulation mit C58C1(pGV2215) oder C58C1(pGV2219)) gegenüber Wildtypumoren (Inokulation mit C58C1(pGV2208)) feststellbar. Die durchgeführte Kinetik (siehe Abb. 6) zeigt dabei, daß dieser Unterschied schon vor dem Auftreten von Sprossen, jedoch nicht in der frühesten Phase der Tumorentwicklung gemessen werden kann. Bis etwa 5-6 Wochen nach der Tumorinduktion sind keine signifikanten Abweichungen im Cytokiningehalt der drei untersuchten Tumortalinien zu beobachten. Wiederum zeigen sich die Unterschiede im Gehalt nur bei Cytokinen vom Zeatinribosidtyp, während die Meßwerte beim Isopentenyladenosintyp gleichbleibend sind.

Im Gegensatz zu den "shooter"-transformierten Tumoren zeigen die mit der "rooter"-Mutante C58C1(pGV2250) inokulierten Pflanzen (T-DNA-Gen 4 defekt) keine Cytokininproduktion, die über den Gehalt von uninfizierten oder mit einem avirulenten Agrobacterium-Stamm (C58C1) inokulierten Geweben hinausgeht (siehe Abb. 6). Durch das Ausschalten von T-DNA-Gen 4 bei C58C1(pGV2250) ist offensichtlich die Information für die Ausbildung eines erhöhten Cytokiningehalts verloren gegangen. Da bei den in vivo-Tumoren auch der Auxingehalt gemessen wurde (Anm.: In hier nicht dargestellten Experimenten cochromatographierte 90-95 % der meßbaren Substanz mit authentischer IES), läßt sich für diese Gewebe eine Aussage über das für die morphologische Entwicklung wichtige Verhältnis von Cytokinen zu Auxin machen (siehe Skoog und Miller 1957). Wie Abb. 7 zu entnehmen ist, bleibt im Beobachtungszeitraum dieses Verhältnis in Abwesenheit eines virulenten Agrobacterium-Stamms konstant; es tritt keine wesentliche Änderung im Cytokinin- oder Auxingehalt auf. Dagegen zeigen die Wildtypumoren einen leichten, die "shooter"-transformierten Gewebe einen starken Anstieg in diesem Verhältnis. Der Anstieg ist jeweils durch die entsprechende Zunahme im Cytokiningehalt bestimmt, da der Auxingehalt, trotz einiger Schwankungen, im Bereich der Konzentration von nichttransformiertem Gewebe bleibt (siehe 3.1.2). Bei den mit der "rooter"-Mutante C58C1(pGV2250) in-

okulierten Pflanzen ist die Reduktion des Cytokinin/Auxin-Verhältnisses auf einen entsprechenden Anstieg des Auxingehalts um den Faktor 2-3 im Vergleich zu untransformiertem Gewebe zurückzuführen, während hier der Cytokinin-gehalt konstant bleibt. Somit zeigen alle hier getesteten Tumorgewebe die von Skoog und Miller (1957) beobachtete enge Korrelation der Zu- bzw. Abnahme des Cytokinin/Auxin-Verhältnisses mit dem Phänotyp des Materials, auch wenn hier noch vor dem Auftreten von Sprossen oder Wurzeln gemessen wurde.

Abbildung 8 verdeutlicht, daß zu Beginn der Tumorentwicklung (9 Tage nach der Inokulation) der gemessene Cytokiningehalt bei dem hier untersuchten, "shooter"-transformierten Gewebe ausschließlich auf Zeatinribosid zurückgeht. Aber bereits nach 16 Tagen, verstärkt jedoch nach 49 Tagen, also zu einem Zeitpunkt, zu dem Cytokinine im Tumorgewebe akkumulieren, treten Substanzen auf, die zwar meßbar sind, aber nicht mit ZR oder Z cochromatographieren. Hierbei muß es sich um polare Derivate von ZR handeln, die in der Pflanze aufgrund des Anstiegs des ZR-Gehalts gebildet werden. Da die Relation der Substanzen zu ZR im Verlauf der Tumorentwicklung nicht gleichbleibt, müssen hier Stoffwechselwege aktiviert werden, die der Konzentrationszunahme von ZR entgegenwirken. Die Natur dieser Substanzen ist wegen fehlender Referenzen und der hier nicht durchgeführten Strukturaufklärung unbekannt.

Die beschriebenen Ergebnisse für Primärtumoren stimmen mit den Resultaten von Weiler und Spanier (1981) und Akiyoshi et al. (1983) im wesentlichen überein. Der bei Weiler und Spanier (1981) beschriebene zeitliche Verlauf der Cytokininkonzentration während der Entwicklung von Wildtyptumoren bei Sinapis alba zeigt ebenfalls einen Anstieg bei Cytokinin vom Zeatinribosidtyp, der kurz vor Erscheinen der ersten äußeren Anzeichen der Tumorentwicklung zu beobachten ist. Auch hier ist nur eine sehr geringe Änderung im Gehalt von Cytokinin des Isopentenyladenosintyps festzustellen. Weiterhin haben auch Weiler und Spanier (1981) bei chromatographischen Analysen von Wildtyptumorge-

weben verschiedener Pflanzenarten eine Vielfalt von meßbaren ZR-Derivaten beobachtet. Da in diesem Fall jedoch die Untersuchungen nur zu einem einzigen Zeitpunkt während der Tumorentwicklung durchgeführt wurden, kann keine Aussage über eine zeitliche Änderung in der Relation verschiedener Derivate zueinander gemacht werden.

Bei Akiyoshi et al. (1983) ist, ähnlich den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen, ein Vergleich verschiedener Agrobacterium-Mutanten mit Defekten in den Genen 1 und/oder 2 bzw. 4 ("shooter"- und "rooter"-Mutanten) und dem Wildtyp erfolgt. Auch diese Autoren stellen fünf Wochen nach der Inokulation bei Nicotiana tabacum einen erhöhten Cytokiningehalt, verbunden mit einem niedrigen Auxingehalt, in "shooter"-induzierten Primärtumoren fest. Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit wird dagegen in "rooter"-induzierten Tumoren bei Vergleich zu nichttransformiertem Gewebe keine Zunahme des Auxin-, sondern eine Abnahme des Cytokiningehalts gemessen, wodurch das Verhältnis der beiden Hormone zueinander auch hier unter dem nichttransformierter Pflanzen liegt. Ein weiterer Unterschied zwischen den in der vorliegenden Arbeit und den von Akiyoshi et al. (1983) beschriebenen Ergebnissen ist die Enzymbehandlung der Extrakte (Phosphatase und Glucosidase), die in der genannten Studie vor der Messung des Cytokiningehalts durchgeführt wurde. Hierdurch werden dem Meßsystem vor allem Glucosederivate der Cytokininseitenkette zugänglich gemacht (Zeatin-O-glucoside), die in der vorliegenden Arbeit nicht erfaßt werden konnten. Eine hohe Konzentration auch dieser Derivate ist zu vermuten, wenn man das breite Spektrum an Cytokininabkömmlingen im Tumorgewebe bedenkt. Dennoch ist der starke Unterschied im Cytokinin/Auxin-Verhältnis der "shooter"-transformierten Gewebe, der bei Vergleich der beiden Arbeiten auffällt, nicht auf sehr viel höhere Cytokininmeßwerte bei Akiyoshi et al. (1983), sondern auf entsprechend niedrigere Auxinwerte zurückzuführen. Insgesamt haben diese Autoren etwa 5-10-fach niedrigere Hormongehalte gemessen.

Aus den bisher dargestellten Ergebnissen läßt sich nur indirekt auf die Funktion der T-DNA-Gene 1, 2 und 4 schließen. Hierbei ist die einfachste Zuordnung einer Funktion bei Gen 4 gegeben: In Anwesenheit des Gens ist bei allen Untersuchungen ein gegenüber der nichtinfizierten Pflanze erhöhter Cytokiningehalt (ZR-Typ) in den transformierten Geweben zu messen. Wird das Gen inaktiviert ("rooter"-Mutante), steigt der Gehalt an Cytokinen im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen dagegen nicht an; Akiyoshi et al. (1983) beobachten sogar eine geringe Abnahme. Da ein höherer Cytokiningehalt auch bei in vitro-Kulturen auftritt, kann diese Zunahme in Anwesenheit des Gens nicht auf die Attraktion von Hormonen aus entfernt liegenden Pflanzenteilen zurückgehen. Es muß daher vermutet werden, daß T-DNA-Gen 4 direkt stimulierend in die Cytokininbiosynthese eingreift. Diese Schlußfolgerung wird auch von Akiyoshi et al. (1983) gezogen.

Schwieriger ist eine Herleitung der Funktion der T-DNA-Gene 1 und 2 aus den bisher dargestellten Ergebnissen. Die Inaktivierung jedes einzelnen Gens oder auch beider Gene gleichzeitig ruft denselben morphologischen Effekt hervor, nämlich eine intensive Sproßbildung des Tumorgewebes (vgl. Garfinkel et al. 1981, Leemans et al. 1982a). Die Inaktivierung der Gene ist in den untersuchten Fällen mit einem höheren Cytokiningehalt im transformierten Gewebe im Vergleich zu Wildtypumoren verbunden. Dies konnte von Akiyoshi et al. (1983) für Mutanten in Gen 1 und in der vorliegenden Arbeit für Doppelmutanten (in vitro-Kulturen 1GV2206 und 1GV2219, beide "shooter"-Mutanten bei in vivo-Inokulationen) und für Mutanten in Gen 2 (in vitro-Zelllinie 1GV2100) gezeigt werden. Diese Äquivalenz in der morphologischen und hormonphysiologischen Wirkung beider Gene läßt auf einen gemeinsamen, inhibitorischen Effekt bei der Cytokininbiosynthese bzw. eine Stimulierung des Cytokininumsatzes (Ab- oder Umbau zu nicht meßbaren und möglicherweise biologisch inaktiven Substanzen) schließen. Vergleichende Messungen von Geweben, die beide Gene intakt enthalten, mit un- oder "shooter"-transformierten Pflanzen

zeigen nicht in allen Fällen eine eindeutige Abhängigkeit höherer Auxingehalte von der Anwesenheit dieser beiden Gene (siehe Weiler und Spanier 1981, Akiyoshi et al. 1983 und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit). Daher kann von diesen Phytohormonmessungen nicht unbedingt auf eine Beteiligung der T-DNA-Gene 1 und 2 bei der Auxinbiosynthese geschlossen werden, obwohl Auxine als Inhibitoren für die Sproßbildung (siehe Skoog und Miller 1957) und Regulatoren des Cytokiningehalts in Pflanzengeweben (Woolley und Wareing 1972, Evans 1984) bekannt sind und somit die geforderte Funktion erfüllen würden.

Wie beschrieben kann mit den durchgeführten Phytohormonmessungen nur ein Indiz für die Funktion von T-DNA-Gen 4, nicht jedoch für die der Gene 1 und 2 geliefert werden. Der direkte Beweis für die Beteiligung der Gene an der Biosynthese von pflanzlichen Hormonen war dagegen erst durch den Einsatz molekulargenetischer Methoden mit anschließend durchgeführten in vitro-Enzymtests möglich (Schröder et al. 1984, Barry et al. 1984, Thomashow et al. 1986). Bestätigt werden konnte hierbei, daß T-DNA-Gen 4 tatsächlich für ein Enzym kodiert, welches aus AMP und DMA-PP ein Cytokinin synthetisiert (siehe Abb. 2). Dieses erste Enzymprodukt ist aber vom Isopentenyladenosintyp, welcher, wie die vorliegende und weitere Arbeiten belegen (siehe Tab. 3; Scott et al. 1980, Weiler und Spanier 1981, Akiyoshi et al. 1983), nicht im transformierten Gewebe akkumuliert. Ob die entsprechend schnelle Hydroxylierungsreaktion zu einem Cytokinin vom Zeatintyp, wie dies für das Vir-Region-Gen tzs beschrieben ist (Beatty et al. 1986), auch durch das Gen 4-Produkt katalysiert werden kann, bleibt unklar. Möglich ist, daß diese Reaktion von pflanzeneigenen Enzymen durchgeführt wird. Eine entsprechende Aktivität konnte von Einset (1984) in nichttransformierten Geweben von *Actinidia* nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den Phytohormonmessungen konnte mit den genannten in vitro-Tests gezeigt werden, daß die Gene 1 und 2 für Enzyme kodieren, die das Auxin Indol-3-essigsäure in

einem zweistufigen Prozeß aus Tryptophan synthetisieren. Der hierbei benutzte Weg über Indol-3-acetamid ist bisher in Pflanzen nicht nachgewiesen worden (Schröder et al. 1984). Somit ergibt sich für die Auxinbiosynthese das in Abb. 20 dargestellte Bild. Wie schon ausgeführt wurde, kann der Eingriff der T-DNA-Gene 1 und 2 in die Auxinbiosynthese sowohl für die beobachteten morphologischen Veränderungen als auch für die Schwankungen des Cytokiningehalts der transformierten Gewebe verantwortlich gemacht werden.

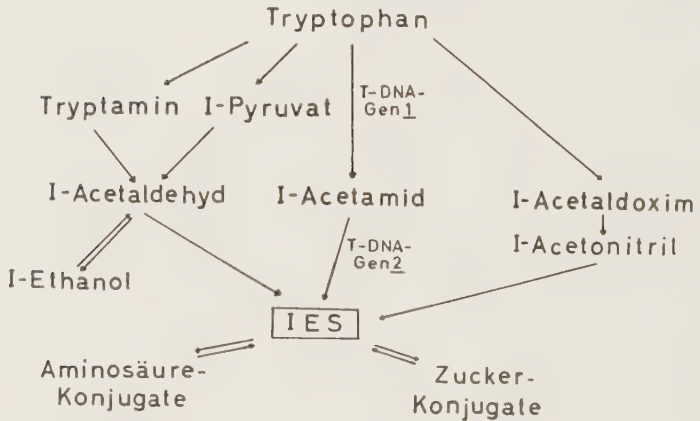


Abb. 20: Biosynthese und Metabolismus des Auxins Indol-3-essigsäure. Dargestellt sind pflanzeigene und durch T-DNA-Gene kontrollierte Biosynthesewege (verändert aus Schröder et al. 1984; vgl. Schneider und Wightman 1974; I- = Indol-)

In einem zweiten Versuchsansatz wurde die bisher unbekannte Funktion von T-DNA-Gen 6b analysiert. Aus widersprüchlichen Beobachtungen verschiedener Autoren konnte hierbei zunächst nur indirekt auf eine Beeinflussung des Cytokininstoffwechsels durch das Gen geschlossen werden. So wurde von Garfinkel et al. (1981) für Kalanchoe daigremontiana eine Vergrößerung von Primärtumoren nach Inaktivierung des Gens beschrieben ("tml"-Phänotyp), was dagegen bei Nicotiana tabacum nicht zu beobachten war. In Untersuchungen von Leemans et al. (1983) und Ream et al. (1983) wurde gezeigt, daß "shooter"-Mutanten mit inaktiven Genen 1 und/oder 2 und einem zusätzlichen Defekt in diesem Gen weiterhin Sprosse induzieren können. Während jedoch Leemans et al. (1983) eine Verstärkung der Sproßbildung nach Ausschalten von Gen 6b feststellten, beobachteten Ream et al. (1983) eine Abschwächung gegenüber solchen "shooter"-Mutanten, bei denen nur die Gene 1 und 2 defekt waren. Aufgrund ihrer Ergebnisse kamen beide Arbeitsgruppen zu dem Schluß, daß Gen 6b die Wirkung von Cytokinin beeinflusst, wobei Leemans et al. (1983) einen negativen, Ream et al. (1983) dagegen einen positiven Effekt postulierten. Da verschiedene Autoren (Willmitzer et al. 1983, Burrell et al. 1985) zeigen konnten, daß das Gen in Tumorgewebe nur sehr schwach exprimiert wird, wurde in der vorliegenden Arbeit die Ursache für das Fehlen eines klaren Phänotyps auf diese Tatsache zurückgeführt. Aus den genannten Gründen erschien es daher notwendig, die Expression des Gens im Pflanzengewebe zu verstärken, um hierdurch eindeutiger physiologische Effekte hervorzurufen. Hierfür mußte das Gen aus dem Ti-Plasmid von Agrobacterium tumefaciens isoliert, mit Hilfe molekulargenetischer Methoden in vitro manipuliert und anschließend unter Ausnutzung des DNA-Transfer-Systems "Agrobacterium" in Pflanzen zurückgebracht werden.

Die Expression eines Gens unterliegt in jedem Organismus einem komplizierten Steuerungssystem, an dem eine Vielzahl verschiedener Komponenten beteiligt ist. Unter anderem wird sie von der primären und sekundären Struktur eines DNA-Abschnitts bestimmt, der der informationstragenden,

genkodierenden Region vorgeschaltet ist. Diese als Promotor bezeichnete Struktur dient der Initiation der Transkription, wobei man abweichende Strukturen in verschiedenen Organismen, aber auch bei Vergleich der Gene eines Organismus gefunden hat (siehe Lewin 1985). So kann man verschieden starke Promotoren unterscheiden, welche die Menge der verfügbaren mRNA der von ihnen kontrollierten Gene in der Zelle maßgebend beeinflussen. Durch Einsatz molekulargenetischer Methoden konnte die strikte Bindung eines Gens an seinen eigenen Promotor aufgehoben werden und es wurde möglich, sog. chimäre Gene zu konstruieren. Hierdurch konnten nicht oder nur sehr schwach wirksame Promotoren durch stärkere ersetzt werden, um beliebige Gene in heterologe Systeme einzubringen und effektiv exprimieren zu lassen (z. B. bakterielle Gene in Pflanzen; Herrera-Estrella et al. 1983a, De Block et al. 1984).

Diese Technik, den Promotor eines Gens gegen einen stärkeren auszutauschen, wurde auch in der vorliegenden Arbeit angewandt, um die Funktion von T-DNA-Gen 6b analysieren zu können. Die kodierende Region von Gen 6b wurde hinter den 1'-Teil des 1'-2'-Doppelpromotors der T_R-DNA kloniert (siehe 3.2.1.4 und Abb. 15). Dieser aus dem Ti-Plasmid pTiAch5 stammende Promotor wurde gewählt, da er eine effiziente Expression chimärer Gene in Pflanzen wie Nicotiana tabacum erlaubt (Velten et al. 1984). Von der hierbei aufgetretenen Vergrößerung des Abstands zwischen der Hognessbox des Promotors und dem Startcodon des einklonierten Gens von 90 (bei Gen 1' in der T_R-DNA) auf 138 bp wurde kein wesentlicher Einfluß auf die Expression erwartet. Velten und Schell (1985) konnten nach Klonieren der kodierenden Region des Chloramphenicol-Acetyltransferasegens von Tn9 und der damit verbundenen Vergrößerung dieses Abstands um etwa 20 bp in transgenischem Pflanzenmaterial eine starke Expression des eingebrachten Gens beobachten. Da der Startpunkt für die Transkription auf dem benutzten Promotor- und nicht auf dem einklonierten Gen-Fragment liegt, wird hier lediglich die 5'-untranslatierte DNA verlängert (Velten, pers. Mitteilung).

Wie oben beschrieben, konnte vermutet werden, daß Gen 6b in den Cytokinstoffwechsel transformierter Pflanzen eingreift. Daher war es nötig, die Funktion des Gens auch unter Bedingungen zu untersuchen, bei denen die Entwicklung der Pflanze durch erhöhte endogene oder exogene Cytokiningehalte beeinflußt wird. Dementsprechend wurde das mit dem 1'-Promotor versehene Gen sowohl mit T-DNA-Gen 4 als auch mit dem in der Vir-Region von Nopalinplasmiden lokalisierten, für ein Enzym der Cytokininbiosynthese kodierenden Gen tzs durch entsprechende Klonierungen kombiniert (siehe 3.2.3.2, 3.2.4, Tab. 4 und die Abbildungen 3 und 15). Hierbei war allerdings zunächst noch unklar, ob das im Bakterium verbleibende Gen tzs über die Ausscheidung des Phytohormons eine ähnliche Wirkung auf Pflanzen haben würde wie exogen angebotenes Cytokinin. Die in der vorliegenden Arbeit ebenfalls hergestellten Konstruktionen, bei denen Gen 6b unverändert, also unter der Kontrolle des T-DNA-eigenen, oder ohne Promotor eingesetzt wurde (siehe 3.2.3.2, Abb. 15 und Tab. 4), dienten zu Vergleichszwecken. Es war zu erwarten, daß eine unterschiedlich starke Expression des Gens physiologische Effekte in entsprechender Weise beeinflussen würde. Alle Konstruktionen wurden in die T-DNA von Agrobacterium eingebracht (siehe 3.2.4 und Tab. 4), da hierdurch die einfachste Möglichkeit gegeben war, die in vitro manipulierte DNA in Pflanzen einzuschleusen.

Die funktionelle Charakterisierung von T-DNA-Gen 6b wurde an einem stark isolierten in vitro-System durchgeführt: Blattscheiben von Nicotiana tabacum (siehe 3.3.1). Wie die Ergebnisse von Horsch et al. (1985) und Steffen (1986) zeigen, ist es mit diesem System möglich, weitgehend homogenes Pflanzenmaterial schnell und reproduzierbar mit Agrobacterium zu transformieren und physiologische Effekte zu analysieren. Darüberhinaus werden durch die in vitro-Kultivierung immer gleichbleibende Bedingungen geschaffen, so daß ein Vergleich verschiedener Experimente auch über längere Zeit hin möglich ist.

Skoog und Miller (1957) haben gezeigt, daß sich Gewebeexplantate in Anwesenheit von Cytokinin und Auxinen entwickeln können, wobei das Verhältnis dieser beiden Hormone zueinander für die Differenzierung bestimmend ist. Bei einem konstanten Auxingehalt des Mediums führt eine niedrige Cytokininkonzentration zur Wurzel-, eine mittlere zur Kallus- und eine hohe zur Sproßproduktion. Die Differenzierungsrichtung ist also unter diesen Bedingungen nur von der Konzentration des exogen angebotenen Cytokinins abhängig. Ergebnisse von Akiyoshi et al. (1983) und der vorliegenden Arbeit deuten ferner darauf hin, daß Differenzierung mit entsprechenden endogenen Hormonverhältnissen korreliert werden kann. Das hier eingesetzte in vitro-System war daher gut geeignet, die Einflußnahme von T-DNA-Gen 6b in Zusammenwirken mit Cytokinin (BAP im Kulturmedium, T-DNA-Gen 4 und Gen tzs) auf die pflanzliche Entwicklung zu untersuchen.

Blattscheibchen von Nicotiana tabacum reagieren auf dem hier benutzten auxinfreien Medium sehr empfindlich auf die exogene Zufuhr von Cytokinin. BAP im Medium in einer Konzentration von 0.01-0.05 mg/l (in Vorversuchen getestet) reicht noch nicht aus, Sprosse zu induzieren. Erst bei 0.1-0.5 mg/l BAP treten zahlreiche Sprosse auf. Andererseits wird die Entwicklung von Sprossen aber schon durch 2 mg/l BAP so stark inhibiert, daß nur noch Ansätze zu beobachten sind, die sich lediglich in Einzelfällen weiterentwickeln. Dieses zeigt, daß unter den hier gewählten Kulturbedingungen Sproßproduktion nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich durch Cytokinine gefördert werden kann, während ein Unter- oder Überschreiten dieses Bereichs zur Reduktion der Sproßbildung führt.

In der vorliegenden Arbeit konnten sich Blattscheibchen, im Gegensatz zu den von Skoog und Miller (1957) durchgeführten Experimenten, auch ohne die Zugabe von exogenem Auxin im Kulturmedium entwickeln. Es ist anzunehmen, daß die Blattexplantate über genügend endogene Auxine verfügen, so daß eine weitere exogene Zufuhr unnötig ist. In hier nicht

dargestellten Vorversuchen zeigte sich, daß eine geringe Auxingabe (0.1 mg/l 1-Naphthyllessigsäure, NAA) eine um den Faktor 10-20 höhere Cytokininkonzentration erforderlich macht, um bei Blattscheibchen Sproßbildung hervorzurufen. Durch den Verzicht auf Auxin im Wachstumsmedium konnte somit eine Steigerung in der Empfindlichkeit des Systems gegenüber Schwankungen der Cytokininkonzentration erreicht werden.

Auf BAP-freiem Medium war Sproßbildung zu beobachten, wenn Blattstückchen mit Agrobacterium-Stämmen inokuliert wurden, die T-DNA-Gen 4 oder Gen tzs im Ti-Plasmid pGV3850 vom Nopalintyp enthielten. Hierbei war die Induktion von Sprossen durch das isolierte T-DNA-Gen 4 zu erwarten, da sie schon von mehreren Autoren beschrieben wurde (z. B. Inze et al. 1984, Steffen 1986). Sproßbildung durch Bakterien mit dem T-DNA-Vektor pGV3850 war dagegen bisher nicht bekannt. Da plasmidfreie Bakterien (C58C1) oder solche, die ein Ti-Plasmid vom Octopintyp enthielten (pGV2260), nicht in der Lage waren, Sprosse hervorzurufen, kann man diese spezifische Fähigkeit von pGV3850 offensichtlich auf die beschriebene Ausscheidung des Cytokinins trans-Zeatin durch die Bakterien zurückführen (Regier und Morris 1982). Die Produktion des Phytohormons wird durch das Gen tzs in der Vir-Region von Nopalin-Ti-Plasmiden kontrolliert (Beaty et al. 1986) und ist, wie die hier beschriebenen Experimente zeigen, stark genug, um in dem benutzten in vitro-System eine optimale Cytokininkonzentration für die Sproßbildung zu erzeugen. Bereits die Zugabe von exogenem BAP in einer Konzentration von 0.1 mg/l führt zu einer deutlichen Reduktion in der Anzahl der gebildeten Sprosse, was auf eine zu hohe Cytokininkonzentration unter diesen Bedingungen hinweist.

Aus Abb. 16 ist zu ersehen, daß durch Inokulation mit Bakterien, welche das Nopalin-Ti-Plasmid enthielten, Sproßbildung bei den Blattscheibchen früher zu beobachten war als bei Behandlung mit BAP. Dieses ist möglicherweise auf einen intensiveren Kontakt der Bakterien mit dem Pflanzenmaterial zurückzuführen. Bei der Inokulation können Bakterien über die Wundränder in das Blatt eindringen und dort aufgrund der

Cytokininausscheidung den beobachteten phänotypischen Effekt auslösen. Hierbei reicht offenbar die physiologische Aktivität weniger Bakterien aus, selbst wenn durch die Behandlung mit dem Antibiotikum Claforan die Mehrzahl nach zwei Tagen, also 8-10 Tage vor Erscheinen der Sprosse, am weiteren Wachstum gehindert werden. Die Tatsache, daß eine fortgesetzte Produktion nach Entfernen der ersten Sprosse und anhaltender Behandlung der Blattstückchen mit Claforan nicht beobachtet werden kann, zeigt die Abhängigkeit der Sproßbildung von der Anwesenheit physiologisch aktiver Bakterien (dieses ist in Abb. 16 durch den zur Abszisse parallel dargestellten Kurvenverlauf für pGV3850 verdeutlicht).

Im Gegensatz dazu kann BAP aus dem Medium nur über die Epidermis des Blattes aufgenommen werden, wodurch die Anregung entsprechender Zellen zur Sproßbildung verzögert wird. Im Fall von T-DNA-Gen 4 treten Sprosse zu einem noch späteren Zeitpunkt auf, da hierbei zunächst die T-DNA in die Pflanzenzellen transferiert werden muß, bevor das Gen exprimiert und eine entsprechende endogene Cytokininproduktion angeregt werden kann. Andererseits ist aber die durch Gen 4 kontrollierte Cytokininsynthese offensichtlich schon sehr früh so stark, daß eine durch exogenes BAP ausgelöste Sproßproduktion teilweise inhibiert wird (siehe 3.3.1, Tab. 6). Dieses wird auch dadurch deutlich, daß die Explantate im Gegensatz zu unbehandelten Blattscheibchen auf hormonfreiem Medium nicht absterben, sondern nach einer Periode von 3-4 Wochen ohne auffällige morphogenetische Reaktion Sprosse bilden können.

In diesem bisher beschriebenen Pflanzensystem wurde die Wirkung von T-DNA-Gen 6b getestet. Hierbei konnten zunächst zwei wichtige Punkte erkannt werden: 1) Das für die Klonierungsarbeiten benutzte T-DNA-Fragment, bestehend aus der kodierenden Region von Gen 6b, einem Teil der kodierenden Region von Gen 6a und der intergenischen Region zwischen diesen beiden Genen, ist unter den hier gewählten Bedingungen nicht in der Lage, die Entwicklung der Blattscheibchen zu beeinflussen. In keinem Fall war bei Einsatz von Gen

6b ohne Promotor ein Unterschied zur entsprechenden Kontrolle erkennbar (siehe 3.3.1). Dieses war aufgrund der bekannten DNA-Sequenz, die kein zusätzliches Gen in diesem Bereich aufweist (Barker et al. 1983, Gielen et al. 1984), zu erwarten. 2) Gen 6b hat alleine keine den Onkogenen 1, 2 und 4 vergleichbare Funktion. Auf hormonfreiem Medium trat weder tumoröses Wachstum, noch Morphogenese auf, wenn Gen 6b unter der Kontrolle des T-DNA-eigenen oder des 1'-Promotors anwesend war. Entsprechend inokulierte Explantate starben ebenso wie unbehandelte Blattscheibchen ab (siehe 3.3.1). Auch Inze et al. (1984) konnten keine Tumorbildung oder sonstige Reaktionen des Gewebes beobachten, wenn dieses nur mit den Genen 6b und 6a transformiert war. Dagegen führte die Anwesenheit beider Auxinbiosynthesegene (Gen 1 und 2) oder des Cytokininbiosynthesegens der T-DNA (Gen 4) aufgrund einer entsprechenden Hormonproduktion zu Kallusbildung, verbunden mit Wurzel- bzw. Sproßentwicklung. Weiterhin ist die Regeneration von Pflanzen, die beide Auxingene bzw. das Cytokininogen intakt enthalten, nicht möglich, während transgenische Pflanzen mit den Genen 6b und 6a (z. B. die in der vorliegenden Arbeit benutzte rG6a/6b) keinen vom untransformierten Wildtyp abweichenden Phänotyp haben.

Obwohl Gen 6b, wie beschrieben, selbst keinen onkogenen Charakter aufweist, kann es doch in die pflanzliche Entwicklung eingreifen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß Gen 6b in der Lage ist, Sproßbildung je nach gewählten Versuchsbedingungen abzuschwächen oder zu verstärken. Wie bereits dargestellt, wird die Sproßproduktion der Blattstückchen im hier benutzten in vitro-System nur durch ganz bestimmte Cytokininkonzentrationen optimal gefördert. Diese Konzentrationen werden z. B. durch 0.5 mg/l BAP im Wachstumsmedium oder durch Gen tzs bzw. T-DNA- Gen 4 auf hormonfreiem Medium erreicht (siehe Tab. 6). Setzt man T-DNA-Gen 6b unter diesen Bedingungen ein, kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Sproßbildung (siehe Abb. 17, Tab. 6). Wenn dagegen die Sproßentwicklung in dem benutzten in vitro-System durch ein Überangebot von Cytokinin (2 mg/l BAP oder Gen tzs bzw. T-DNA- Gen 4 auf Medium mit 0.5 mg/l BAP)

inhibiert wird, führt der Einsatz von Gen 6b zur Steigerung der Sproßproduktion (siehe Abb. 18 und Tab. 6). Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß T-DNA-Gen 6b hemmend in den Cytokininhaushalt der Pflanze eingreifen kann.

Cytokinine unterliegen im Pflanzengewebe einem intensiven Metabolismus. So sind Abbaureaktionen durch Oxidation (McGaw und Horgan 1983) und eine Vielzahl von Derivatisierungsprodukten (z. B. Letham et al. 1982) bekannt. Die biologische Relevanz dieser Derivate ist nicht immer klar. Es kann sich um verschiedene biologisch aktive Substanzen, Transport-, Speicher- und Detoxifizierungsformen oder Zwischenprodukte in der Biosynthese handeln (Letham und Palni 1983). Einen Eindruck von der Komplexität des Cytokininstoffwechsels gibt Abb. 21, in der auch die durch T-DNA-Gen 4 (DMA-Transferase) kontrollierte Reaktion wiedergegeben ist. Für einige der hier abgebildeten Reaktionswege konnten entsprechende Enzyme in Pflanzengeweben charakterisiert werden (z.B. Entsch und Letham 1979, Chen und Kristopeit 1981, Chen 1982, Chen et al. 1982, Entsch et al. 1983). Kerbauy et al. (1986) fanden unterschiedliche Cytokininkonzentrationen in verschiedenen Zellen eines Gewebes. Es ist daher vorstellbar, daß eine solche Kompartimentierung sogar innerhalb einer Zelle auftritt, wie es für andere Phytohormone schon gezeigt wurde (z.B. Drake 1979, Behl et al. 1981, Davidonis et al. 1982, Behl und Hartung 1986). Weiterhin ist bekannt, daß Biosynthese, Abbau, Derivatisierung und Transport von Cytokinin durch die übrigen Phytohormone stark beeinflusst werden können (siehe Scott 1984 und hierin besonders Kapitel 1 und 2).

Angesichts dieser Dynamik des Cytokininstoffwechsels sind verschiedene Mechanismen denkbar, über die T-DNA-Gen 6b in den Hormonhaushalt eingreifen könnte. Es besteht die Möglichkeit, daß Gen 6b (bzw. sein Genprodukt) die Biosynthese von Cytokinin in der Pflanzenzelle unterdrückt. Dieses könnte durch eine entsprechende Genregulation oder kompetitive Hemmung der für die Synthese verantwortlichen

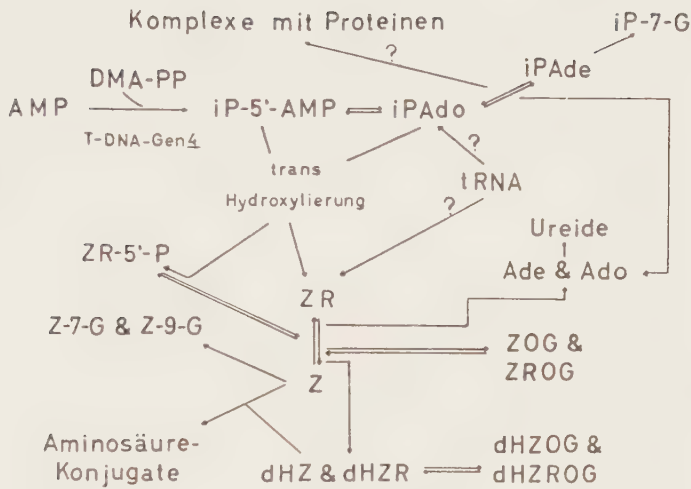


Abb. 21: Metabolismus von Cytokinin in Pflanzen. 'T-DNA-Gen 4' bezeichnet die durch dieses Gen kontrollierte erste Reaktion in der Biosynthesekette (verändert aus Letham et al. 1982)

Enzyme geschehen, etwa der durch T-DNA-Gen 4 kodierten DMA-Transferase. Dieser Vermutung widerspricht jedoch, daß die Wirkung von T-DNA-Gen 6b auf die Sproßbildung auch dann beobachtet werden kann, wenn diese durch das Produkt des in *Agrobacterium* verbleibenden Gens *tzs* oder exogenes BAP im Wachstumsmedium ausgelöst wird. In beiden Fällen werden den Explantaten bereits hochwirksame Cytokinine zugeführt.

Um Sproßbildung auslösen zu können, müssen diese exogenen Cytokinine in die Pflanzenzellen aufgenommen werden. Kommt es hier zu einer Hemmung des Transports, sind höhere exogene Cytokininkonzentrationen erforderlich, um eine entsprechende

Reaktion des Gewebes zu bewirken. Da auch im Fall von T-DNA-Gen 4 für die Sproßinduktion ein Transport von Cytokinen aus Zellen, die mit diesem Gen transformiert sind, in nichttransformierte nötig ist (Leemans et al. 1983), kann eine solche Hemmung der Hormonaufnahme nicht ausgeschlossen werden. T-DNA-Gen 6b könnte somit für die Bildung einer Substanz verantwortlich sein, die im Pflanzengewebe frei diffundiert und mögliche Transportrezeptoren blockiert. Untersuchungen von Laloue et al. (1981) deuten jedoch darauf hin, daß BAP nicht über einen aktiven Transport aufgenommen wird, sondern durch Diffusion in die Zelle gelangt. Diese Ergebnisse würden der möglichen Blockierung von Transportrezeptoren widersprechen.

Eine weitere Möglichkeit ist, daß T-DNA-Gen 6b an der Derivatisierung von Cytokinen beteiligt ist. Wie in 3.3.3 beschrieben, konnte in verschiedenen Pflanzengeweben eine fluoreszierende Substanz gefunden werden, welche in Anwesenheit von Gen 6b (unter der Kontrolle des T-DNA-eigenen Promotors) in erhöhter Konzentration vorlag (siehe Abb. 19). Diese Substanz ist durch Beta-Glucosidase spaltbar und es gibt massenspektroskopische Hinweise, daß es sich hierbei um ein Cytokininderivat handelt, bei dem mehrere Zuckerreste in verschiedenen Positionen, u. a. der Hydroxylgruppe der Seitenkette, an einen Zeatingrundkörper gebunden sind. Da die Substanz auch nach der Beta-Glucosidasespaltung mit dem ZR-Antikörper nicht reagiert (siehe 3.3.3), ist anzunehmen, daß sich am N⁷ oder C⁸ des Adeninringsystems ein entsprechend großer Rest befindet, der die Reaktion sterisch behindert. Für eine exakte Identifizierung dieser fluoreszierenden Substanz sind weitere Analysen erforderlich.

Solche stark veränderten Cytokininderivate werden als äußerst stabile Speicherformen angesehen, die selbst keine oder nur sehr geringe physiologische Aktivität aufweisen (Letham und Palni 1983). Es ist vorstellbar, daß T-DNA-Gen 6b für ein Enzym kodiert, das dieses Produkt synthetisiert und somit aktive Cytokine in eine inaktive Form überführt. Da die Substanz auch in nichttransformierten Geweben

vorhanden ist, würde Gen 6b eine entsprechende pflanzen-eigene Aktivität nur verstärken. Es wäre zu erwarten, daß transgenische Pflanzen, die T-DNA-Gen 6b unter Kontrolle des 1'-Promotors der T_R-DNA enthalten, aufgrund einer stärkeren Expression nochmals erhöhte Konzentrationen der fluoreszierenden Substanz aufweisen. Solche Pflanzen liegen vor (siehe 3.3.2), sind aber zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht groß genug, um entsprechende Experimente durchzuführen.

Für eine eindeutige Klärung der Funktion von T-DNA-Gen 6b sind weiterführende Experimente erforderlich. Um zu untersuchen, ob Gen 6b für eine Blockierung der Cytokinin-aufnahme, für eine Verstärkung der Derivatisierung oder für eine Stimulation des Cytokininabbaus verantwortlich ist, könnten transformierte Pflanzengewebe mit radioaktiv markierten Cytokinin- gefüttert werden. Hierbei ist besonders die in der vorliegenden Arbeit beschriebene fluoreszierende Substanz von Interesse. Findet man in transgenischen Pflanzen gegenüber Wildtypgeweben eine verstärkte Akkumulation der angebotenen Radioaktivität in dieser Substanz, wäre dies ein weiterer deutlicher Hinweis auf eine Gen 6b-bedingte Derivatisierung von Cytokinin- en. Weiterhin könnte Gen 6b unter Ausnutzung der in der vorliegenden Arbeit entwickelten DNA-Konstrukte (pKSK3 oder pKSK4, siehe 3.2.1.3) in E. coli exprimiert werden, um mit dem isolierten Protein in vitro-Studien durchzuführen. Dieses würde die Möglichkeit eröffnen, die Funktion des Gens direkt zu analysieren. Ähnlich den mit den Produkten der T-DNA-Gene 1 bis 4 durchgeführten Enzymtests (Schröder et al. 1984, Barry et al. 1984, Gafni und Chilton 1985, Thomashow et al. 1986), könnten verschiedene Substrate, insbesondere Cytokinine, eingesetzt und die Reaktions- produkte charakterisiert werden.

Durch die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse werden die widersprüchlichen Beobachtungen von Leemans et al. (1983) und Ream et al. (1983) verständlich. Der hemmende Einfluß von Gen 6b auf den Cytokininhaushalt kann sowohl eine Reduktion (wie bei Nicotiana tabacum var. W38; siehe

Leemans et al. 1983), als auch die Verstärkung der durch T-DNA-Gen 4 hervorgerufenen Sproßbildung (wie bei Nicotiana tabacum var. Xanthi; siehe Ream et al. 1983) erklären. Aufgrund der Tatsache, daß beide Autorengruppen unterschiedliche Varietäten des Tabaks benutzt haben, kann man verschiedene endogene Hormongehalte oder abweichende Empfindlichkeiten des Materials gegenüber Cytokininern vermuten; Skvirsky et al. (1982) konnten deutliche Unterschiede in der Cytokininempfindlichkeit zweier Kultivare von Petunia hybrida nachweisen. Weiterhin ist der bei Garfinkel et al. (1981) beschriebene, nur schwach ausgeprägte Effekt von Gen 6b offensichtlich auf die geringe Expression des Gens zurückzuführen. Erst der Ersatz des T-DNA-eigenen durch den 1'-Promotor der T_R -DNA und die Verwendung eines stark isolierten, empfindlichen in vitro-Systems, in dem auch ein physiologischer Effekt des Gens tzs zu beobachten war, machte in der vorliegenden Arbeit den Einfluß von Gen 6b auf den Cytokininstoffwechsel deutlich.

Letztlich stellt sich die Frage, welche Bedeutung T-DNA-Gen 6b für Agrobacterium tumefaciens haben könnte. Da nur von wenigen untersuchten Pflanzenarten, wie Nicotiana tabacum oder Solanum tuberosum, Daten über die Stärke der Genexpression vorliegen, ist nicht auszuschließen, daß dem Gen in anderen Arten eine wichtige regulative Funktion zukommt. Diese Regulation könnte ein Gegengewicht zur Gen 4-induzierten Tumorphysproliferation darstellen, um eine zu starke Schädigung der Pflanze zu verhindern und Agrobacterium somit über eine längere Zeit mit Opinen zu versorgen (Konzept der genetischen Kolonisierung, siehe Schell et al. 1979). Hierdurch wäre sichergestellt, daß Agrobacterium tumefaciens die ökologische Nische "Crown Gall" optimal ausnutzen kann.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche zur funktionellen Charakterisierung der T-DNA-Gene des phytopathogenen Bakteriums Agrobacterium tumefaciens durchgeführt. Mit Hilfe spezifischer Radioimmunoassays wurde zunächst der Einfluß der T-DNA-Gene 1, 2 und 4 auf den Phytohormonhaushalt der Pflanze untersucht. Als Ausgangsmaterial dienten in vitro- und in vivo-Gewebe, die durch verschiedene Agrobacterium-Mutanten mit Defekten in diesen Genen transformiert waren. Hierbei wurden folgende Ergebnisse erhalten:

1. In allen untersuchten Fällen ist eine direkte Korrelation erhöhter Cytokiningehalte mit der Anwesenheit des intakten Gens 4 festzustellen. Hierbei treten in sproßbildenden Tumorgeweben, in denen die Gene 1 und/oder 2 defekt sind, mindestens 3-5-fach höhere Cytokininkonzentrationen auf als in unorganisierten Wildtypumoren.
2. Der Anstieg der Cytokininkonzentration ist in in vivo-Tumoren mit einer intensiven Metabolisierung der Cytokine verbunden. Dabei werden hauptsächlich polare Metabolite beobachtet.
3. Bei Einsatz von Bakterien mit Defekten in den T-DNA-Genen 1 und/oder 2, sowie den hier untersuchten Wildtypbakterien, ist in in vivo-Tumoren keine vom untransformierten Gewebe abweichende Auxinkonzentration meßbar. Dagegen wird ein höherer Auxingehalt in Tumorgeweben beobachtet, bei denen Gen 4 als einziges Gen der T-DNA defekt ist.

Aus diesen Ergebnissen kann eine direkte Beteiligung von T-DNA-Gen 4 an der Cytokininbiosynthese abgeleitet werden. Der durch Gen 4 hervorgerufenen Akkumulation von Cytokinen wird in der Pflanze durch Metabolisierung entgegengewirkt, wobei inaktive Speicher- oder Detoxifizierungsformen gebildet werden. Eine vermutete Beteiligung der T-DNA-Gene 1 und 2 an der Auxinbiosynthese ist nicht herzuleiten, obwohl eine

Auxinproduktion durch diese Gene die beobachtete Unterdrückung der Sproßbildung bei Wildtypumoren und den damit verbundenen niedrigeren Cytokiningehalt erklären würde.

In einem zweiten Versuchsansatz wurde die bisher unbekannte Funktion von Gen 6b analysiert. Hierzu wurde das Gen mit Hilfe molekulargenetischer Methoden aus der T-DNA isoliert, mit einem stärkeren Promotor versehen und in Agrobacterium zurückgeführt. Da eine Beteiligung des Gens am Cytokininstoffwechsel vermutet werden konnte, wurde die Funktion von Gen 6b in Zusammenwirken mit T-DNA-Gen 4, Gen tzs (einem in der Vir-Region von Nopal-Plasmiden vorhandenen Gen für die Cytokinbiosynthese) und exogenem BAP an einem isolierten in vitro-System untersucht. Diese Experimente führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Blattscheibchen von Nicotiana tabacum werden durch exogenes BAP, T-DNA-Gen 4 und Gen tzs zu intensiver Sproßbildung angeregt. Hierbei zeigt die Behandlung mit BAP, daß Sprosse nur in einem engen Bereich der Cytokininkonzentration auftreten. Wird dieser Bereich unter- oder überschritten, etwa durch die kombinierte Wirkung von BAP im Wachstumsmedium und T-DNA-Gen 4 bzw. Gen tzs, ist eine Reduktion der Sproßbildung zu beobachten.
2. T-DNA-Gen 6b hat keinen onkogenen Charakter. Blattscheibchen, die auf hormonfreiem Medium nur mit Gen 6b behandelt werden, sterben ebenso wie unbehandelte Explantate ab.
3. Wirkt Gen 6b mit einer oder mehreren der getesteten Cytokininquellen zusammen, kann eine starke Beeinflussung der Sproßbildung beobachtet werden. In Abhängigkeit von den gewählten Versuchsbedingungen tritt eine Förderung oder Unterdrückung der Sproßproduktion durch das Gen auf.

Die Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß T-DNA-Gen 6b inhibierend in den Cytokininstoffwechsel der Pflanze eingreift. Es wird vermutet, daß das Genprodukt die Metabolisierung aktiver Cytokinine zu glycosidierten Speicherformen fördert. Diese Annahme wird durch die erste Charakterisierung eines möglichen, auch in Wildtypgeweben in geringerer Konzentration vorhandenen Cytokininderivats in Gen 6b-transformierten Pflanzen unterstützt.

6 VERZEICHNISSE

6.1 Abkürzungen

MS _S -Medium	Medium nach Murashige und Skoog 1962; ohne Hormone, Inosit, Folsäure und Edamin
YEB-Medium	Medium nach Van Larebeke et al. 1977
YT-, dYT-Medium	Medien nach Miller 1972
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer nach Maniatis et al. 1982
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer nach Maniatis et al. 1982
Amp	Ampicillin
Cb	Carbenicillin
Km	Kanamycin
Rif	Rifampicin
Sm	Streptomycin
Sp	Spectinomycin
Tet	Tetracyclin
nptII	Gen der Neomycinphosphotransferase für Kanamycinresistenz
CDTA	Cyclohexandiamintetraessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
DTT	DL-Dithiothreitol
PEG	Polyethylenglycol
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan- hydrochlorid
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
X-Gal	5-Brom-4-chlorindolyl-beta-D-galaktosid
EIA	Enzymimmunoassay
RIA	Radioimmunoassay
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Nos	Nopalinsynthase
Tn5, Tn7, Tn9	Transposon 5, 7, 9
bp	Basenpaare
kb	Kilobasenpaare
UPM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
IAM	Indol-3-acetamid
IES	Indol-3-essigsäure
Ade, Ado	Adenin, Adenosin
BAP	6-Benzylaminopurin
DMA-PP	Dimethylallylpyrophosphat
Z	Zeatin
-7-G	-7-glucosid
-9-G	-9-glucosid
OG	-0-glucosid
R	-ribosid
R-5'-P	-ribosyl-5'-monophosphat
ROG	-ribosyl-0-glucosid
dHZ	Dihydrozeatin
OG	-0-glucosid
R	-ribosid
ROG	-ribosyl-0-glucosid
iP	Isopentenyl
-5'-AMP	-adenosin-5'-monophosphat
-7-G	-7-glucosid
Ade	-adenin
Ado	-adenosin

6.2 Tabellen

	Seite
Tab. 1 : <u>In vitro</u> -Kulturen von <u>Nicotiana tabacum</u>	17
Tab. 2 : Plasmide, Bakterien- und Phagenstämme; Ausgangsmaterial	18
Tab. 3a: Cytokinine vom Zeatinribosidtyp in Steril- kulturen von <u>Nicotiana tabacum</u>	33
Tab. 3b: Cytokinine vom Isopentenyladenosintyp in Sterilkulturen von <u>Nicotiana tabacum</u>	33
Tab. 4 : <u>Agrobacterium</u> -Stämme für die funktionelle Charakterisierung von T-DNA-Gen <u>6b</u>	56
Tab. 5 : Behandlungen von Blattstückchen von <u>Nicotiana tabacum</u> für die Analyse von T-DNA-Gen <u>6b</u>	58
Tab. 6 : Einfluß von T-DNA-Gen <u>6b</u> unter Kontrolle des 1'-Promotors der T _R -DNA auf die Sproßproduktion bei Blattstückchen von <u>Nicotiana tabacum</u>	66

6.3 Abbildungen

	Seite
Abb. 1: Strukturformeln der Hauptvertreter der fünf Phytohormonklassen	2
Abb. 2: Phytohormonsynthese mit von den T-DNA-Genen <u>1</u> , <u>2</u> und <u>4</u> kodierten Enzymen	9
Abb. 3: Gene für die Cytokininbiosynthese bei Ti-Plasmiden vom Nopalintyp	14
Abb. 4: Habitus von <u>in vitro</u> -Kulturen von <u>Nicotiana tabacum</u>	34
Abb. 5: Tumorentwicklung bei "shooter"-transformierten Pflanzen von <u>Nicotiana tabacum</u>	36
Abb. 6: Cytokinine während der Entstehung von Crown Gall Tumoren bei <u>Nicotiana tabacum</u>	37
Abb. 7: Cytokinin/Auxin-Verhältnis bei Crown Gall Tumoren von <u>Nicotiana tabacum</u>	39
Abb. 8: Verteilung von Cytokininderivaten in Tumorextrakten von <u>Nicotiana tabacum</u>	40
Abb. 9: Schematische Darstellung der T _L -DNA eines Ti-Plasmids vom Octopintyp	42
Abb. 10: Nukleotidsequenz von T-DNA-Gen <u>6b</u>	43
Abb. 11: Fortschreitende Bal31-Verdauung von T-DNA-Gen <u>6b</u> enthaltender pUC8-DNA	46
Abb. 12: DNA-Sequenz des Übergangs von Vektor- in T-DNA bei M13KSK1	48
Abb. 13: Klonierungsschritte für die Herstellung einer promotorlosen Gen <u>6b</u> -Konstruktion	49
Abb. 14: Restriktionsanalyse der binären T-DNA-Vektoren pSRB3 und pSRB4	52
Abb. 15: Plasmide mit verschiedenen Fragmenten der T _L -DNA eines Ti-Plasmids vom Octopintyp	54

Abb. 16:	Induktion von Sprossen bei Blattstückchen von <u>Nicotiana tabacum</u> unter verschiedenen Versuchsbedingungen	62
Abb. 17:	Inhibition der Sproßbildung bei Blattstückchen von <u>Nicotiana tabacum</u> durch die Wirkung von T-DNA-Gen <u>6b</u>	64
Abb. 18:	Stimulation der Sproßbildung bei Blattstückchen von <u>Nicotiana tabacum</u> durch die Wirkung von T-DNA-Gen <u>6b</u>	65
Abb. 19:	HPLC-Elutionsprofile methanolischer Extrakte von <u>Nicotiana tabacum</u> var. W38 und der transgenen Pflanze rG6a/6b	69
Abb. 20:	Biosynthese und Metabolismus des Auxins Indol-3-essigsäure	78
Abb. 21:	Metabolismus von Cytokininen in Pflanzen	87

6.4 Literatur

- Akiyoshi DE, Morris RO, Hinz R, Mischke BS, Kosuge T, Garfinkel DJ, Gordon MP, Nester EW (1983) Cytokinin/auxin balance in crown gall tumors is regulated by specific loci in the T-DNA. Proc Natl Acad Sci USA 80, 407-411.
- Akiyoshi DE, Klee H, Amasino RM, Nester EW, Gordon MP (1984) T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA 81, 5994-5998.
- Akiyoshi DE, Regier DA, Jen G, Gordon MP (1985) Cloning and nucleotide sequence of the *tzs* gene from *Agrobacterium tumefaciens* strain T37. Nucl Acid Res 13, 2773-2788.
- Amasino RM, Miller CO (1982) Hormonal control of tobacco crown gall tumor morphology. Plant Physiol 69, 389-392.
- Amasino RM, Miller CO (1982/83) Effect of temperature on the morphology and cytokinin levels of tobacco crown gall teratoma tissues. Plant Sci Lett 28, 245-253.
- Amasino RM, Powell ALT, Gordon MP (1984) Changes in T-DNA methylation and expression are associated with phenotypic variation and plant regeneration in a crown gall tumor line. Mol Gen Genet 197, 437-446.
- Badenoch-Jones J, Letham DS, Parker CW, Rolfe BG (1984) Quantitation of cytokinins in biological samples using antibodies against zeatin riboside. Plant Physiol 75, 1117-1125.
- Barker RF, Idler KB, Thompson DV, Kemp JD (1983) Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine T1 plasmid p115955. Plant Mol Biol 2, 335-340.
- Berry GF, Rogers SG, Fraley HT, Brand L (1984) Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. Proc Natl Acad Sci USA 81, 4776-4780.
- Beatty JS, Powell GK, Luca L, Regier DA, MacDonald EMS, Hommes NG, Morris RO (1986) *Tzs*, a nopaline Ti plasmid gene from *Agrobacterium tumefaciens* associated with trans-zeatin biosynthesis. Mol Gen Genet 203, 274-280.
- Behl R, Hartung W (1986) Movement and compartmentation of abscisic acid in guard cells of *Valerianella locusta*: Effects of osmotic stress, external H^+ -concentration and fusicoccin. Planta 168, 360-368.
- Behl R, Jeschke WD, Hartung W (1981) A compartmental analysis of abscisic acid in roots of *Hordeum distichon*. J Exper Bot 32, 889-897.
- Bevan M (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. Nucl Acid Res 12, 8711-8721.
- Bialeski RL (1964) The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. Anal Biochem 9, 431-442.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl Acid Res 7, 1513-1523.

- Boliver F, Rodriguez RL, Green PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles - II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95-113.
- Bomhoff G, Klapwijk PM, Kester HCM, Schilperoort RA, Hernalsteens JP, Schell J (1976) Octopine and nopaline synthesis and breakdown genetically controlled by a plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet* 145, 177-181.
- Boyer HW, Roulland-Dussoix D (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 41, 459-472.
- Braun AC (1947) Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in crown gall. *Am J Bot* 34, 234-240.
- Braun AC (1958) A physiological basis for autonomous growth of the crown-gall tumor cell. *Proc Natl Acad Sci* 44, 344-349.
- Braun AC, White PR (1943) Bacteriological sterility of tissues derived from secondary crown-gall tumors. *Phytopathol* 33, 85-100.
- Brenner ML (1981) Modern methods for plant growth substance analysis. *Ann Rev Plant Physiol* 32, 511-538.
- Buchmann I, Marner F-J, Schröder G, Waffenschmidt S, Schroder J (1985) Tumor genes in plants: T-DNA encoded cytokinin biosynthesis. *EMBO J* 4, 853-859.
- Burrell MM, Twell D, Karp A, Ooms G (1985) Expression of shoot-inducing Ti TL-DNA in differentiated tissues of potato (*Solanum tuberosum* cv Maris Bard). *Plant Mol Biol* 5, 213-222.
- Caplan AB, Van Montagu M, Schell J (1985) Genetic analysis of integration mediated by single T-DNA borders. *J Bacteriol* 161, 655-664.
- Chaconas G, Van De Sande JH, Church RB (1975) End group labelling of RNA and double stranded DNA by phosphate exchange catalyzed by bacteriophage T4 induced polynucleotide kinase. *Biochem Biophys Res Comm* 66, 962-969.
- Chen C-M (1982) Cytokinin Biosynthesis in cell-free systems. In: Wareign PF, ed., *Plant growth substances 1982*. Academic Press, London New York, 155-163.
- Chen C-M, Kristopeit SM (1981) Metabolism of cytokinin: Deribosylation of cytokinin ribonucleoside by adenosine nucleosidase from wheat germ cells. *Plant Physiol* 68, 1020-1023.
- Chen C-M, Melitz DK, Clough FW (1982) Metabolism of cytokinin: Phosphoribosylation of cytokinin bases by adenine phosphoribosyltransferase from wheat germ. *Arch Biochem Biophys* 214, 634-641.
- Chilton M-D, Drummond MH, Merlo DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11, 263-271.
- Close TJ, Zaitlin D, Kado CI (1984) Design and development of amplifiable broad-host-range cloning vectors: Analysis of the vir region of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiC58. *Plasmid* 12, 111-118.

- Currier TC, Nester EW (1976) Evidence for diverse types of large plasmids in tumor-inducing strains of *Agrobacterium*. *J Bacteriol* 126, 157-165.
- Davidonis GH, Hamilton RH, Mumma RO (1982) Evidence for compartmentalization of conjugates of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soybean callus tissue. *Plant Physiol* 70, 939-942.
- De Block M, Herrera-Estrella L, Van Montagu M, Schell J, Zambryski P (1984) Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. *EMBO J* 3, 1681-1689.
- De Cleene M, De Ley J (1976) The host range of crown gall. *Bot Rev* 42, 389-466.
- De Greve H, Leemans J, Hernalsteens J-P, Thia-Toong L, De Beuckeleer M, Willmitzer L, Otten L, Van Montagu M, Schell J (1982) Regeneration of normal and fertile plants that express octopine synthase, from tobacco crown galls after deletion of tumour-controlling functions. *Nature* 300, 752-755.
- Deblaeere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J (1985) Efficient octopine T1 plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer into plants. *Nucl Acid Res* 13, 4777-4788.
- Drake GA (1979) Flux studies and compartmentation analysis of gibberellin A1 in oat coleoptiles. *J Exper Bot* 30, 429-437.
- Einset JW (1984) Conversion of N6-isopentenyladenine to zeatin by actinidia tissues. *Biochem Biophys Res Comm* 124, 470-474.
- Ellis JG, Ryder MH, Tate ME (1984) *Agrobacterium tumefaciens* TR-DNA encodes a pathway for agropine biosynthesis. *Mol Gen Genet* 195, 466-473.
- Engler G, Depicker A, Maenhaut R, Villarroel R, Van Montagu M, Schell J (1981) Physical mapping of DNA base sequence homologies between an octopine and a nopaline T1 plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Mol Biol* 152, 183-208.
- Entsch B, Letham DS (1979) Enzymic glucosylation of the cytokinin, 6-benzylaminopurine. *Plant Sci Lett* 14, 205-212.
- Entsch B, Parker CW, Letham DS (1983) An enzyme from lupin seeds forming alanine derivatives of cytokinins. *Phytochem* 22, 375-381.
- Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y (1983) *Handbook of plant cell culture Vol I - Techniques for propagation and breeding*. MacMillan Publishing Co, New York.
- Evans ML (1984) Functions of hormones at the cellular level of organization. In: Scott TK, ed., *Hormonal regulation of plant development II - The functions of hormones from the level of the cell to the whole plant*. In: Pirson A, Zimmermann MH, eds., *Encyclopedia of plant physiology. New Series Vol 10*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 23-79.
- Feung C-S, Hamilton RH, Mumma RO (1976) Metabolism of indole-3-acetic acid - III. Identification of metabolites isolated from crown gall callus tissue. *Plant Physiol* 58, 666-669.

- Follin A, Inze D, Budar F, Genetello C, Van Montagu M, Schell J (1985) Genetic evidence that the tryptophan 2-mono-oxygenase gene of *Pseudomonas savastanoi* is functionally equivalent to one of the T-DNA genes involved in plant tumour formation by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet* 201, 178-185.
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL, Woo SC (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 4803-4807.
- Gafni Y, Chilton M-D (1985) Expression of the nopaline synthase gene in *Escherichia coli*. *Gene* 39, 141-146.
- Garfinkel DJ, Nester EW (1980) *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *J Bacteriol* 144, 732-743.
- Garfinkel DJ, Simpson RB, Ream LW, White FF, Gordon MP, Nester EW (1981) Genetic analysis of crown gall: Fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. *Cell* 27, 143-153.
- Gevin SB, Karcher SJ, Goldsbrough PB (1985) Use of a TR T-DNA promoter to express genes in plants and bacteria. *Mol Gen Genet* 199, 240-248.
- Gheysen G, Dhaese P, Van Montagu M, Schell J (1985) DNA flux across genetic barriers: The crown gall phenomenon. In: Hohn B, Dennis ES, eds., *Genetic flux in plants*. In: Dennis ES, Hohn B, Hohn T, King PJ, Schell J, Verma DPS, eds., *Plant gene research - Basic knowledge and application*. Springer-Verlag, Wien New York, 11-47.
- Gielen J, De Beuckeleer M, Seurinck J, Deboeck F, De Greve H, Lemmers M, Van Montagu M, Schell J (1984) The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. *EMBO J* 3, 835-846.
- Goldberg SB, Flick JS, Rogers SG (1984) Nucleotide sequence of the tmr locus of *Agrobacterium tumefaciens* pTi T37 T-DNA. *Nucl Acids Res* 12, 4665-4677.
- Greenwood JS, Chrispeels MJ (1985) Correct targeting of the bean storage protein phaseolin in the seeds of transformed tobacco. *Plant Physiol* 79, 65-71.
- Gurley WB, Kemp JD, Albert MJ, Sutton DW, Callis J (1979) Transcription of Ti plasmid-derived sequences in three octopine-type crown gall tumor lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 2828-2832.
- Hack E, Kemp JD (1980) Purification and characterization of the crown gall-specific enzyme, octopine synthase. *Plant Physiol* 65, 949-955.
- Hedden P, MacMillan J, Phinney BO (1978) The metabolism of the gibberellins. *Ann Rev Plant Physiol* 29, 149-192.
- Hendrix RW, Roberts JW, Stahl FW, Weisberg RA, eds. (1983) *Lambda II*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Herrera-Estrella L, Depicker A, Van Montagu M, Schell J (1983a) Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303, 209-213.

- Herrera-Estrella L, De Block M, Messens E, Hernalsteens J-P, Van Montagu M, Schell J (1983b) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. EMBO J 2, 987-995.
- Heß D (1979) Pflanzenphysiologie. Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Hille J, Wullems G, Schilperoort R (1983) Non-oncogenic T-region mutants of *Agrobacterium tumefaciens* do transfer T-DNA into plant cells. Plant Mol Biol 2, 155-163.
- Hille J, Van Kan J, Schilperoort R (1984) Trans-acting virulence functions of the octopine T1 plasmid from *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol 158, 754-756.
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* T1 plasmid. Nature 303, 179-180.
- Hoekema A, Van Haaren MJJ, Fellingner AJ, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1985) Non-oncogenic plant vectors for use in the *Agrobacterium* binary system. Plant Mol Biol 5, 85-89.
- Holsters M, Silva B, Van Vliet F, Genetello C, De Block M, Dhaese P, De Packer A, Inze D, Engler G, Villarroel R, Van Montagu M, Schell J (1980) The functional organization of the nopaline A. *tumefaciens* plasmid pTiC58. Plasmid 3, 212-230.
- Holsters M, Villarroel R, Gielen J, Seurinck J, De Greve H, Van Montagu M, Schell J (1983) An analysis of the boundaries of the octopine TL-DNA in tumors induced by *Agrobacterium tumefaciens*. Mol Gen Genet 190, 35-41.
- Hooykaas PJJ, Roobol C, Schilperoort RA (1979) Regulation of the transfer of T1 plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. J Gen Microbiol 110, 99-109.
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. Science 227, 1229-1231.
- Hutcheson SW, Kosuge T (1985) Regulation of 3-indoleacetic acid production in *Pseudomonas syringae* pv. savastanoi - Purification and properties of tryptophan 2-monooxygenase. J Biol Chem 260, 6281-6287.
- Inze D, Follin A, Van Lijsebettens M, Simoens C, Genetello C, Van Montagu M, Schell J (1984) Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*; further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. Mol Gen Genet 194, 265-274.
- Itoh Y, Watson JM, Haas D, Leisinger T (1984) Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas* plasmid pVS1. Plasmid 11, 206-220.
- Janssens A, Engler G, Zambryski P, Van Montagu M (1984) The nopaline C58 T-DNA region is transcribed in *Agrobacterium tumefaciens*. Mol Gen Genet 195, 341-350.
- Joos H, Inze D, Caplan A, Sormann M, Van Montagu M, Schell J (1983) Genetic analysis of T-DNA transcripts in nopaline crown galls. Cell 32, 1057-1067.

- Kado CI (1984) Phytohormone-mediated tumorigenesis by plant pathogenic bacteria. In: Verma DPS, Hohn T, eds., Genes involved in microbe-plant interactions. In: Dennis ES, Hohn B, Hohn T, King PJ, Schell J, Verma DPS, eds., Plant gene research - Basic knowledge and application. Springer-Verlag, Wien New York, 311-336.
- Kaulen H, Schell J, Kreuzaler F (1986) Light-induced expression of the chimeric chalcone synthase-NPTII gene in tobacco cells. EMBO J 5, 1-8.
- Kazama H, Katsumi M (1973) Auxin-gibberellin relationships in their effects on hypocotyl elongation of light-grown cucumber seedlings. Responses of sections to auxin, gibberellin and sucrose. Plant Cell Physiol 14, 449-458.
- Kazama H, Katsumi M (1974) Auxin-gibberellin relationships in their effects on hypocotyl elongation of light-grown cucumber seedlings II. Effect of GA3-pretreatment on IAA-induced elongation. Plant Cell Physiol 15, 307-314.
- Kemper E, Waffenschmidt S, Weiler EW, Rausch T, Schröder J (1985) T-DNA-encoded auxin formation in crown-gall cells. Planta 163, 257-262.
- Kerbauf GB, Peters JA, Hell KG (1986) Cytokinin autotrophy and differentiation in tissue cultures of haploid Nicotiana tabacum L.. Plant Sci 45, 125-132.
- Klee H, Montoya A, Horodyski F, Lichtenstein C, Garfinkel D, Fuller S, Flores C, Peschon J, Nester E, Gordon M (1984) Nucleotide sequence of the tms genes of the pTiA6NC octopine Ti plasmid: Two gene products involved in plant tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci USA 81, 1728-1732.
- Koncz C, Kreuzaler F, Kalman Z, Schell J (1984) A simple method to transfer, integrate and study expression of foreign genes, such as chicken ovalbumin and alpha-actin in plant tumors. EMBO J 3, 1029-1037.
- Laloue M, Pethe-Terrine C, Guern J (1981) Uptake and metabolism of cytokinins in tobacco cells: Studies in relation to the expression of their biological activities. In: Guern J, Peaud-Lenoel C, eds., Metabolism and molecular activities of cytokinins. Springer-Verlag, Berlin, 80-96.
- Langley KE, Villarejo MR, Fowler AV, Zamenhof PJ, Zabin I (1975) Molecular basis of beta-galactosidase alpha-complementation. Proc Natl Acad Sci USA 72, 1254-1257.
- Leemans J, Shaw C, Deblaere R, De Greve H, Hernalsteens JP, Maes M, Van Montagu M, Schell J (1981) Site-specific mutagenesis of Agrobacterium Ti plasmids and transfer of genes to plant cells. J Mol Appl Genet 1, 149-164.
- Leemans J, Deblaere R, Willmitzer L, De Greve H, Hernalsteens JP, Van Montagu M, Schell J (1982a) Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown galls. EMBO J 1, 147-152.
- Leemans J, De Greve H, Hernalsteens JP, Shaw C, Willmitzer L, Otten L, Van Montagu M, Schell J (1982b) Ti plasmids and direct genetic engineering. In: Kahl G, Schell J, eds., Molecular biology of plant tumours. Academic Press, New York London Paris San Diego San Francisco Sao Paulo Sydney Tokyo Toronto, 537-545.

- Leemans J, Hernalsteens JP, Deblaere R, De Greve H, Thia-Toong L, Van Montagu M, Schell J (1983) Genetic analysis of T-DNA and regeneration of transformed plants. In: Puehler A, ed., Molecular genetics of the bacteria-plant interaction. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 322-330.
- Lemmers M, De Beuckeleer M, Holsters M, Zambryski P, Depicker A, Hernalsteens JP, Van Montagu M, Schell J (1980) Internal organization, boundaries and integration of Ti-plasmid DNA in nopaline crown gall tumours. J Mol Biol 144, 353-376.
- Letham DS, Palni LMS (1983) The biosynthesis and metabolism of cytokinins. Ann Rev Plant Physiol 34, 163-197.
- Letham DS, Tao GQ, Parker CW (1982) An overview of cytokinin metabolism. In: Wareing PF, ed., Plant growth substances 1982. Academic Press, London New York, 143-153.
- Lewin B (1985) Genes. John Wiley & Sons, New York Chichester Brisbane Toronto Singapore.
- Liu S-T, Kado CI (1979) Indoleacetic acid production: A plasmid function of Agrobacterium tumefaciens C58. Biochem Biophys Res Comm 90, 171-178.
- Liu S-T, Perry KL, Schardl CL, Kado CI (1982) Agrobacterium Ti plasmid indoleacetic acid gene is required for crown gall oncogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 79, 2812-2816.
- Lundquist RC, Close TJ, Kado CI (1984) Genetic complementation of Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid mutants in the virulence region. Mol Gen Genet 193, 1-7.
- Maille M (1983) A radiotechnique suitable for the detection of octopine synthesis in crown-gall tissues grown in vitro. Anal Biochem 134, 133-136.
- Maliga P, Sz.-Breznovits A, Marton L (1973) Streptomycin-resistant plants from callus culture of haploid tobacco. Nature New Biol 244, 29-30.
- Maliga P, Sz.-Breznovits A, Marton L, Joo F (1975) Non-mendelian streptomycin-resistant tobacco mutant with altered chloroplasts and mitochondria. Nature 255, 401-402.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J, (1982) Molecular cloning - A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York.
- Matzke MA, Susani M, Binns AN, Lewis ED, Rubenstein I, Matzke AJM (1984) Transcription of a zein gene introduced into sunflower using a Ti plasmid vector. EMBO J 3, 1525-1531.
- McGaw BA, Horgan R (1983) Cytokinin oxidase from Zea mays kernels and Vinca rosea crown-gall tissue. Planta 159, 30-37.
- Messens E, Lenaerts A, Van Montagu M, Hedges RW (1985) Genetic basis for opine secretion from crown gall tumour cells. Mol Gen Genet 199, 344-348.
- Messing J, Gronenborn B, Müller-Hill B, Hofschneider PH (1977) Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: Insertion of a HindII fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 74, 3642-3646.

- Milborrow BV (1974) The chemistry and physiology of abscisic acid. *Ann Rev Plant Physiol* 25, 259-307.
- Miller CO (1961) A kinetin-like compound in maize. *Proc Natl Acad Sci* 47, 170-174.
- Miller CO (1965) Evidence for the natural occurrence of zeatin and derivatives: Compounds from maize which promote cell division. *Proc Natl Acad Sci* 54, 1052-1058.
- Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15, 473-497.
- Neill SJ, Horgan R, Heald JK (1983) Determination of the levels of abscisic acid-glucose ester in plants. *Planta* 157, 371-375.
- Otten LABM, Schilperoort RA (1978) A rapid micro scale method for the detection of lysopine and nopaline dehydrogenase activities. *Biochim Biophys Acta* 527, 497-500.
- Palni LMS, Horgan R (1983) Cytokinin biosynthesis in crown gall tissue of *Vinca rosea*: Metabolism of isopentenyladenine. *Phytochem* 22, 1597-1601.
- Palni LMS, Summons RE, Letham DS (1983) Mass spectrometric analysis of cytokinins in plant tissues - V. Identification of the cytokinin complex of *Datura innoxia* crown gall tissue. *Plant Physiol* 72, 858-863.
- Palni LMS, Palmer MV, Letham DS (1984) The stability and biological activity of cytokinin metabolites in soybean callus tissue. *Planta* 160, 242-249.
- Powell GK, Morris RO (1986) Nucleotide sequence and expression of a *Pseudomonas savastanoi* cytokinin biosynthetic gene: Homology with *Agrobacterium tumefaciens* *tmr* and *tzs* loci. *Nucl Acid Res* 14, 2555-2565.
- Ream LW, Gordon MP, Nester EW (1983) Multiple mutations in the T region of the *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 1660-1664.
- Reeve DR, Crozier A (1980) Quantitative analysis of plant hormones. In: MacMillan J, ed., *Hormonal regulation of plant development I - Molecular aspects of plant hormones*. In: Pirson A, Zimmermann MH, eds., *Encyclopedia of plant physiology*. New Series Vol 9, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 203-280.
- Regier DA, Morris RO (1982) Secretion of trans-zeatin by *Agrobacterium tumefaciens*: A function determined by the nopaline Ti plasmid. *Biochem Biophys Res Comm* 104, 1560-1566.
- Rubin RA (1986) Genetic studies on the role of octopine T-DNA border regions in crown gall tumor formation. *Mol Gen Genet* 202, 312-320.
- Rüther U (1980) Construction and properties of a new cloning vehicle, allowing direct screening for recombinant plasmids. *Mol Gen Genet* 178, 475-477.

- Rüther U (1982) pUR250 allows rapid chemical sequencing of both DNA strands of its inserts. *Nucl Acid Res* 10, 5765-5772.
- Sachs RM (1965) Stem elongation. *Ann Rev Plant Physiol* 16, 73-96.
- Salomon F, Deblaere R, Leemans J, Hernalsteens J-P, Van Montagu M, Schell J (1984) Genetic identification of functions of TR-DNA transcripts in octopine crown galls. *EMBO J* 3, 141-146.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467.
- Schell J (1986) The T-DNA genes of *Agrobacterium* plasmids appear to be of a complex evolutionary origin. In: Gustafson JP, Stebbins GL, Ayala FJ, eds., *Genetics, development, and evolution*. Plenum Publishing Corporation, 343-353.
- Schell J, Van Montagu M (1977) The Ti-plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*, a natural vector for the introduction of nif genes in plants?. In: Hollaender A et al., eds., *Genetic engineering for nitrogen fixation*. Plenum Publishing Corporation, New York, 159-179.
- Schell J, Van Montagu M, De Beuckeleer M, De Block M, Depicker A, De Wilde M, Engler G, Genetello C, Hernalsteens JP, Holsters M, Seurinck J, Silva B, Van Vliet F, Villarroel R (1979) Interactions and DNA transfer between *Agrobacterium tumefaciens*, the Ti-plasmid and the plant host. *Proc R Soc Lond B* 204, 251-266.
- Schneider EA, Wightman F (1974) Metabolism of auxin in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol* 25, 487-513.
- Schreier PH, Seftor EA, Schell J, Bohnert HJ (1985) The use of nuclear-encoded sequences to direct the light-regulated synthesis and transport of a foreign protein into plant chloroplasts. *EMBO J* 4, 25-32.
- Schroder G, Klipp W, Hillebrand A, Ehring R, Koncz C, Schroder J (1983) The conserved part of the T-region in Ti-plasmids expresses four proteins in bacteria. *EMBO J* 2, 403-409.
- Schroder G, Waffenschmidt S, Weiler EW, Schroder J (1984) The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. *Eur J Biochem* 138, 387-391.
- Sciaky D, Montoya AL, Chilton M-D (1978) Fingerprints of *Agrobacterium* Ti plasmids. *Plasmid* 1, 238-253.
- Scott IM, Browning G, Eagles J (1980) Ribosylzeatin and zeatin in tobacco crown gall tissue. *Planta* 147, 269-273.
- Scott TK, ed. (1984) Hormonal regulation of plant development II - The functions of hormones from the level of the cell to the whole plant. In: Pirson A, Zimmermann MH, eds., *Encyclopedia of plant physiology*. New Series Vol 10, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo.

- Sembdner C, Gross D, Liebisch H-W, Schneider G (1980) Biosynthesis and metabolism of plant hormones. In: MacMillan J, ed., Hormonal regulation of plant development I - Molecular aspects of plant hormones. In: Pirson A, Zimmermann MH, eds., Encyclopedia of plant physiology. New Series Vol 9, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 281-444.
- Sexton R, Roberts JA (1982) Cell biology of abscission. *Ann Rev Plant Physiol* 33, 133-162.
- Shaw CH, Leemans J, Shaw CH, Van Montagu M, Schell J (1983) A general method for the transfer of cloned genes to plant cells. *Gene* 23, 315-330.
- Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol* 11, 118-131.
- Skvirsky RC, Hanson MR, Ausubel FM (1982) A genetic approach for studying plant regeneration: Analysis of cytokinin-controlled shoot morphogenesis from tissue explants of *Petunia hybrida*. In: Earle ED, Demarly Y, eds., Variability in plants regenerated from tissue culture. Praeger Publishers, 101-120.
- Smith EF, Townsend CO (1907) A plant-tumor of bacterial origin. *Science* 25, 671-673.
- Stachel SE, Nester EW (1986) The genetic and transcriptional organization of the *vir* region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J* 5, 1445-1454.
- Stachel SE, Messens E, Van Montagu M, Zambryski P (1985) Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318, 624-629.
- Stachel SE, Nester EW, Zambryski PC (1986a) A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 379-383.
- Stachel SE, Timmermann B, Zambryski P (1986b) Generation of single-stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium* to plant cells. *Nature* 322, 706-712.
- Steffen A (1986) Induktion von Morphogenese in pflanzlichen Zellkulturen mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*. Dissertation, Bochum.
- Tay SAB, Macleod JK, Palni LMS (1986) On the reported occurrence of *cis*-zeatin riboside as a free cytokinin in tobacco shoots. *Plant Sci* 43, 131-134.
- Thomashow MF, Hugly S, Buchholz WG, Thomashow LS (1986) Molecular basis for the auxin-independent phenotype of crown gall tumor tissues. *Science* 231, 616-618.
- Van Haute E, Joos H, Maes M, Warren G, Van Montagu M, Schell J (1983) Intergeneric transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR322: A novel strategy for the reversed genetics of the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J* 2, 411-417.
- Van Larebeke N, Engler G, Holsters M, Van Den Elsacker S, Zaenen I, Schilperoort RA, Schell J (1974) Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252, 169-170.

- Van Larebeke N, Genetello C, Hernalsteens JP, De Picker A, Zaenen I, Messens E, Van Montagu M, Schell J (1977) Transfer of T₁ plasmids between *Agrobacterium* strains by mobilisation with the conjugative plasmid RP4. *Mol Gen Genet* 152, 119-124.
- Van Onckelen H, Rüdelsheim P, Hermans R, Horemans S, Messens E, Hernalsteens J-P, Van Montagu M, De Greef J (1984) Kinetics of endogenous cytokinin, IAA and ABA levels in relation to the growth and morphology of tobacco crown gall tissue. *Plant Cell Physiol* 25, 1017-1025.
- Van Onckelen H, Rüdelsheim P, Inze D, Follin A, Messens E, Horemans S, Schell J, Van Montagu M, De Greef J (1985) Tobacco plants transformed with the *Agrobacterium* T-DNA gene 1 contain high amounts of indole-3-acetamide. *FEBS Lett* 181, 373-376.
- Van Onckelen H, Prinsen E, Inze D, Rüdelsheim P, Van Lijsebettens M, Follin A, Schell J, Van Montagu M, De Greef J (1986) *Agrobacterium* T-DNA gene 1 codes for tryptophan 2-monooxygenase activity in tobacco crown gall cells. *FEBS Lett* 198, 357-360.
- Van Slogteren GMS, Hoge JHC, Hooymaas PJJ, Schilperoort RA (1983) Clonal analysis of heterogeneous crown gall tumor tissues induced by wild-type and shooter mutant strains of *Agrobacterium tumefaciens* - Expression of T-DNA genes. *Plant Mol Biol* 2 321-333
- Velten J, Schell J (1985) Selection-expression plasmid vectors for use in genetic transformation of higher plants. *Nucl Acid Res* 13, 6981-6998.
- Velten J, Willmitzer L, Leemans J, Ellis J, Deblaere R, Van Montagu M, Schell J (1983) TR genes involved in agropine production. In: Puehler A, ed., *Molecular genetics of the bacteria-plant interaction*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 303-312.
- Velten J, Velten L, Main R, Schell J (1984) Isolation of a dual plant promoter fragment from the T₁ plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J* 3, 2723-2730.
- Vieira J, Messing J (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19, 259-268.
- Wang K, Herrera-Estrella L, Van Montagu M, Zambryski P (1984) Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell* 38, 455-462.
- Weiler EW (1980) Radioimmunoassays for trans-zeatin and related cytokinins. *Planta* 149, 155-162.
- Weiler EW (1981a) Radioimmunoassay for pmol-quantities of indole-3-acetic acid for use with highly stable ¹²⁵I- and ³H-IAA derivatives as radiotracers. *Planta* 153, 319-325.
- Weiler EW (1981b) Dynamics of endogenous growth regulators during the growth cycle of a hormone-autotrophic plant cell culture. *Naturwiss* 68, 377-378.
- Weiler EW (1982) Plant hormone immunoassay. *Physiol Plant* 54, 230-234.
- Weiler EW (1984) Immunoassay of plant growth regulators. *Ann Rev Plant Physiol* 35, 85-95.

- Weiler EW, Spanier K (1981) Phytohormones in the formation of crown gall tumors. *Planta* 153, 326-337.
- White PR, Braun AC (1941) Crown gall production by bacteria-free tumor tissues. *Science* 94, 239-241.
- Willmitzer L, De Beuckeleer M, Lemmers M, Van Montagu M, Schell J (1980) DNA from Ti plasmid present in nucleus and absent from plastids of crown gall plant cells. *Nature* 287, 359-361.
- Willmitzer L, Otten L, Simons G, Schmalenbach W, Schröder J, Schröder G, Van Montagu M, De Vos G, Schell J (1981) Nuclear and polysomal transcripts of T-DNA in octopine crown gall suspension and callus cultures. *Mol Gen Genet* 182, 255-262.
- Willmitzer L, Simons G, Schell J (1982) The TL-DNA in octopine crown-gall tumours codes for seven well-defined polyadenylated transcripts. *EMBO J* 1, 139-146.
- Willmitzer L, Dhaese P, Schreier PH, Schmalenbach W, Van Montagu M, Schell J (1983) Size, location and polarity of T-DNA-encoded transcripts in nopaline crown gall tumors; common transcripts in octopine and nopaline tumors. *Cell* 32, 1045-1056.
- Woolley DJ, Wareing PF (1972) The role of roots, cytokinins and apical dominance in the control of lateral shoot form in *Solanum andigena*. *Planta* 105, 33-42.
- Yadav NS, Vanderleyden J, Bennett DR, Barnes WM, Chilton M-D (1982) Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 6322-6326.
- Yamada T, Palm CJ, Brooks B, Kosuge T (1985) Nucleotide sequences of the *Pseudomonas savastanoi* indoleacetic acid genes show homology with *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 6522-6526.
- Yang SF, Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol* 35, 155-189.
- Yeoman MM (1986) Plant cell culture technology. Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh Boston Palo Alto Melbourne.
- Yokota T, Murofushi N, Takahashi N (1980) Extraction, purification, and identification. In: MacMillan J, ed., Hormonal regulation of plant development I - Molecular aspects of plant hormones. In: Pirson A, Zimmermann MH, eds., Encyclopedia of plant physiology. New Series Vol 9, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 113-201.
- Zaenen I, Van Larebeke N, Teuchy H, Van Montagu M, Schell J (1974) Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J Mol Biol* 86, 109-127.
- Zambryski P, Depicker A, Kuger K, Goodman HM (1982) Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. *J Mol Appl Genet* 1, 361-370.
- Zambryski P, Joos H, Genetello C, Leemans J, Van Montagu M, Schell J (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J* 2, 2143-2150.

Zambryski P, Herrera-Estrella L, De Block M, Van Montagu M, Scheil J (1984) The use of the Ti plasmid of *Agrobacterium* to study the transfer and expression of foreign DNA in plant cells: New vectors and methods. In: Lea PJG, Steward GR, eds., Genetic manipulation in plants and its application to agriculture - Ann Proc Phytochem Soc Europe. Vol 22, 243-263.

Zenk MH (1961) 1-(Indole-3-acetyl)-beta-D-glucose, a new compound in the metabolism of indole-3-acetic acid in plants. *Nature* 191, 493-494.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. Schell für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und seine Betreuung im Verlauf dieser Arbeit. Herrn Dr. P.H. Schreier danke ich für seine immerwährende Bereitschaft zur Diskussion und seine Hilfestellung beim Erlernen der molekularbiologischen Methoden.

Herrn Dr. M. Linscheid, Herrn Dr. H. Münster, Herrn Dr. M. John, und Herrn Dr. J. Schmidt gilt mein Dank für ihre wertvolle Unterstützung bei der Isolation und ersten Strukturbestimmung der Gen 6b-spezifischen Substanz.

Frau M. Feck, Frau I. Jung, Frau H. Thiessen, Frau B. Förster und Herrn E. Czerni sei für ihre hilfreiche Unterstützung, insbesondere bei der Erhaltung und Betreuung des Pflanzenmaterials gedankt.

Für die Überlassung von Bakterienstämmen und diversem Pflanzenmaterial danke ich Herrn Prof. J.-P. Hernalsteens, Herrn Prof. J. Schröder, Herrn Priv. Doz. Dr. L. Willmitzer, Herrn Dr. D. Inze, Herrn Dr. J. Velten und Herrn Dr. R. Deblaere.

Allen Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung, Köln-Vogelsang, sei für viele hilfreiche Gespräche gedankt.

Herrn Prof. Dr. O. Schieder und Herrn Prof. Dr. N. Amrhein danke ich für die Übernahme des Haupt- und Korreferates.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Ehefrau, Adelheid, für ihre Geduld und wertvolle Hilfestellung beim Erstellen dieser Dissertation.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN:

Name: S P A N I E R
Vorname: Kurt

Geburtsdatum: 20. Dezember 1955
Geburtsort: 4650 Gelsenkirchen

Eltern: Alfred Spanier
Elsbeth Spanier geb. van Fürden

Familienstand: verheiratet mit Dr. Adelheid Spanier,
geb. Steffen, Dipl. Biologin

AUSBILDUNG:

1962 - 1966 Volksschule Gelsenkirchen
1966 - 1967 Städt. Grillo-Gymnasium Gelsenkirchen
1967 - 1974 Carl-Friedrich-Gauß-Gymnasium Gelsenkirchen
1974 Abitur
1974 - 1975 Grundwehrdienst
1975 - 1980 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
1980 Diplom bei Prof. Dr. M.H. Zenk, Ruhr-Univer-
sität Bochum
Thema der Diplomarbeit: Hormonhaushalt von
Pflanzentumoren
1981 - 1986 Promotion bei Prof. Dr. J. Schell am
Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung
in Köln-Vogelsang

